



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

**Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja
producidas por tratamientos reductores y térmicos y su
relación con propiedades funcionales**

Silvana Petruccelli

Tesis

1993

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Doctora María Cristina Añón.

A papá

A mis hermanos

A Chela

*De vez en cuando hay que hacer
una pausa*

*contemplarse a sí mismo
sin la fruición cotidiana*

*examinar el pasado
rubro por rubro
etapa por etapa
baldosa por baldosa*

*y no llorarse las mentiras
sino cantarse las verdades*

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

A la Dra M. Cristina Añón por haberme dirigido a lo largo de estos años brindándome el marco de libertad necesario para mi formación y por su apoyo constante, tanto en lo científico como en lo personal.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por haberme otorgado las becas que me permitieron la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por la formación científica y humana que me brindó.

Al Dr. Ricardo Zamponi y a la Dra. Estela Arrese por su orientación y apoyo al inicio de este trabajo.

A los Bioq. Nora Martinez, Sara Molina, Adriana Scilingo, Germán Jovanovich, Fernando Chirido y Patricio de Urraza por su participación en la puesta a punto de metodología y en la discusión de resultados.

Al Sr. Aldo Campana por su cuidadosa realización de las fotografías del presente trabajo.

Al Sr. Sergio Torres por su valiosa ayuda tanto en la construcción como en la reparación de equipos.

Al Sr. Arturo Colavita por su apoyo técnico en mis primeros años de trabajo en el instituto.

Al Ing. Néstor Serena por su colaboración en el funcionamiento de equipos.

A la Srta. Cecilia Corda por su eficiencia en la búsqueda de artículos científicos.

A mis familiares y amigos que me apoyaron durante estos años.

Muy en especial a todos mis compañeros del CIDCA por su colaboración y amistad.

INDICE

INTRODUCCION	Página
1. Importancia de las proteínas de soja.....	1
2. Composición química de los porotos de soja.....	2
3. Proteínas de soja.....	3
3.1. Características estructurales de la globulina 7S o β -conglucina.....	5
3.2. Características estructurales de la globulina 11S o glicina.....	7
3.3. Comparación de las estructuras de las globulinas 7S y 11S.....	9
4. Derivados proteicos de soja.....	10
5. Propiedades funcionales.....	14
6. Relación entre propiedades estructurales y funcionales.....	22
7. Propiedades funcionales de las proteínas de soja.....	28
 OBJETIVOS.....	 40
 MATERIALES Y METODOS	
1. Obtención de aislados.....	41
1.1. Aislados utilizados en la caracterización estructural.....	41
1.2. Aislados utilizados en los estudios de reducción.....	41
1.3. Aislados utilizados en los estudios de agregación.....	41
1.4. Aislados utilizados en las medidas de propiedades fisicoquímicas y funcionales.....	42
2. Obtención de las fracciones 7S y 11S crudas.....	43
3. Cinética de la reacción de sulfitólisis.....	43
4. Cinética de agregación.....	44
5. Caracterización estructural	
5.1. Electroforesis	
5.1.1. Electroforesis disociantes (SDS-PAGE).....	45
5.1.2. Electroforesis no disociantes	
5.1.2.1. Electroforesis alcalina.....	46
5.1.2.2. Electroforesis ácida.....	46
5.1.3. Electroforesis bidimensionales.....	47

5.2. Determinación del contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales	
5.2.1. Determinación de grupos sulfhidrilos libres.....	48
5.2.2. Determinación de grupos sulfhidrilos totales.....	48
5.3. Calorimetría diferencial de barrido.....	49
5.4. Determinación de la hidrofobicidad superficial.....	51
5.5. Determinación de la hidrofobicidad total.....	53
 6. Medida de propiedades funcionales	
6.1. Solubilidad en agua.....	53
6.2. Capacidad de retención de agua.....	53
6.3. Viscosidad.....	54
6.4. Propiedades emulsionantes	
6.4.1. Medida de la actividad emulsionante.....	55
6.4.2. Determinación de la desestabilización por floculación y cremado.....	56
6.4.3. Determinación de la desestabilización de la emulsión por coalescencia	59
6.4.4. Determinación de la proteína retenida en la interfase.....	59
6.5. Propiedades espumantes	
6.5.1. Determinación de la capacidad de espumado.....	59
6.5.2. Determinación de la estabilidad de la espuma.....	60

RESULTADOS Y DISCUSION

Sección 1: Componentes de una aislado y sus interacciones	61
Sección 2: Tratamientos reductores	83
Sección 3: Tratamientos térmicos	100
Sección 4: Propiedades estructurales y funcionales	117
1. Propiedades estructurales	
1.1. Grado de desnaturalización.....	119
1.2. Contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales.....	120
1.3. Grado de asociación-disociación.....	123
1.4. Hidrofobicidad.....	130
2. Propiedades funcionales	

2.1. Solubilidad.....	136
2.2. Capacidad de retención de agua.....	137
2.3. Viscosidad.....	138
2.4. Propiedades emulsionantes.....	139
2.4.1. Actividad emulsionante.....	139
2.4.2. Estabilidad de las emulsiones.....	141
2.4.2.1. Desestabilización por floculación y cremado.....	141
2.4.2.2. Desestabilización por coalescencia.....	145
2.4.3. Relación entre los distintos métodos utilizados para evaluar propiedades emulsionantes.....	146
2.5. Propiedades espumantes	
2.5.1. Capacidad espumante.....	149
2.5.2. Estabilidad de la espuma.....	149
3. Relación entre propiedades estructurales y funcionales.....	152
CONCLUSIONES.....	159
BIBLIOGRAFIA.....	163

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ANS	ácido 8-anilino-1-naftalen sulfónico
BHT	hidroxi tolueno butilado
CPA	ácido cis-parinámico
DPH	1,6 difenil-1,3,5 hexatrieno
DTNB	ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilen diamino tetracético (sal disódica)
Gly	glicina
NTB	ácido 2-nitro-5-tiobenzoico
NTSB	ácido 2-nitro-5-tiosulfobenzoico
SDS	lauril sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamina
Tris	tris (hidroximetil aminometano)
H_0	hidrofobicidad superficial
H_T	hidrofobicidad total
IAE	índice de actividad emulsionante
k	constante de incorporación de líquido a la espuma
k_1	constante de velocidad de desestabilización por floculación y cremado correspondiente a los primeros 500 segundos
k_2	constante de velocidad de desestabilización por floculación y cremado correspondiente al período 500-2500 segundos
SH_L	sulfhidrilos libres
SH_T	sulfhidrilos totales
V_c	volumen de fase acuosa en el equilibrio
V_i	volumen intersticial de agua en la fase crema
ϕ	fracción volumétrica de aceite
η_{ap}	viscosidad aparente
μ	fuerza iónica
PI	punto isoeléctrico
PM	peso molecular

INTRODUCCION

1. Importancia de las proteínas de soja.

En la actualidad se estima que la producción de proteínas es adecuada para alimentar a la población mundial. Sin embargo la malnutrición proteica prevalece en muchas regiones. Una de las razones que justifica este hecho es que el 70% de la producción mundial de proteínas proviene de fuentes vegetales como cereales y leguminosas. Aunque muchas de estas proteínas, especialmente las de leguminosas, son baratas y abundantes, su uso en la alimentación humana está restringido. Generalmente son empleadas para la alimentación de ganado y por ende para producir proteínas animales. La utilización directa de la mayoría de las proteínas vegetales en la alimentación humana es muy limitada pues carecen, a diferencia de las proteínas de origen animal, del comportamiento funcional requerido para la elaboración de alimentos (Damodaran, 1989).

La mayor parte de alimentos formulados son espumas, emulsiones o productos similares a geles, por lo tanto, para que las proteínas vegetales puedan utilizarse como ingredientes de estos productos, deben poseer propiedades funcionales como solubilidad, capacidad de espumado, emulsificación y gelificación (Damodaran, 1989).

Las propiedades funcionales están determinadas por las propiedades físicas, químicas, estructurales y conformacionales de la proteína. Dependen del tamaño, forma, composición aminoacídica, secuencia, carga y su distribución, contenido de estructura secundaria (α -hélice, β -plegada y estructuras aperiódicas), ordenamiento terciario y cuaternario de los segmentos peptídicos, crosslinking intra e intercatenario y relación rigidez/flexibilidad en respuesta a condiciones externas. Diversos factores tales como condiciones de proceso, método de aislamiento, factores ambientales (pH, fuerza iónica y temperatura) y la interacción con otros componentes alteran la funcionalidad de las proteínas (Damodaran, 1989).

Muchos productos obtenidos de la soja como: salsa de soja, "miso" (pasta fermentada de soja), natto (porotos de soja fermentados), "tempeh" (porotos de soja fermentados y fritos), "sufu" (coágulo de proteínas de soja fermentadas), "kinako" (harina de soja tostada), leche de soja, "tofu" (coágulo de proteínas de soja no fermentado), "yuba" (film de proteínas hecho a partir de una leche de soja), etc. han desempeñado, durante centurias, un importante papel desde el punto de vista nutricional como fuente dietaria de proteínas en comunidades

orientales. Recientemente se ha puesto la atención en la soja como una fuente económica de proteínas de calidad, desarrollándose nuevos productos como los concentrados y aislados de proteínas de soja, los productos texturizados, etc. (Fukushima, 1991 b). En la fabricación de estos productos las proteínas de soja han sido sometidas a diferentes tratamientos a fin de conferirle las características funcionales deseadas para ser utilizados en la elaboración de alimentos, reemplazando en forma parcial o total a las proteínas de origen animal.

2. Composición química de los porotos de soja.

La soja o *Glycine max* (L) es una leguminosa que se origina en el este asiático. Existen más de 300 variedades que se distinguen en su color, tamaño, forma y composición. El poroto de soja tiene tres componentes estructurales mayores: la cáscara, el cotiledón y el hipocotiledón que representan el 8, 90 y 2 % del poroto, respectivamente. Las proteínas se encuentran almacenadas en el cotiledón como cuerpos proteicos, cuyo diámetro varía entre 2-20 μ m. Estos cuerpos proteicos resisten el molido de la semilla y se han aislado de harinas desgrasadas. Los lípidos están localizados en estructuras pequeñas denominadas esferosomas de diámetro 0.2-0.5 μ m (Pearson, 1982). El poroto entero de soja está compuesto por 35 % de proteínas, 20% de lípidos, 12% de agua, el resto de los componentes son hidratos de carbono. Los lípidos se caracterizan por su alto grado de insaturación (que es aproximadamente 60%); los hidratos de carbono por la ausencia de almidón y por presentar oligosacáridos no reductores como sacarosa, estaquiosa y rafinosa (Fukushima, 1991 a). Vitaminas y minerales como hierro y calcio están presentes en cantidades sustanciales (Visser y Thomas, 1987). Los cuerpos proteicos poseen las proteínas de reserva que son las proteínas mayoritarias en el poroto maduro, y que se caracterizan por ser escasas en número y por poseer alto peso molecular (mayor que 100 000 Da). En contraste las proteínas estructurales y funcionales son más numerosas y tienen bajo peso molecular (Pearson, 1982). Las proteínas de reserva más importantes son las globulinas 7S y 11S. La producción de estas globulinas está regulada en forma diferencial: la globulina 7S se acumula más rápido que la 11S. La síntesis de las subunidades constituyentes de estas globulinas también está regulada diferencialmente, formándose primero por ejemplo las subunidades α y α' de la β -conglitinina y luego la subunidad β . Además las condiciones de crecimiento de las plantas

(por ejemplo presencia de aminoácidos azufrados) modifican las proporciones de 7S y 11S como así también el porcentaje de las distintas subunidades (Utsumi, 1992). La importancia de las proteínas de soja desde el punto de vista nutricional se debe a su alto contenido de aminoácidos esenciales, particularmente lisina, leucina e isoleucina (Visser y Thomas, 1987).

3. Proteínas de soja.

El 90% de las proteínas de una harina de soja son solubles en agua y aproximadamente el 75% de las mismas precipitan a pH 4.5-4.8, dando origen a un producto que se llama precipitado ácido de proteínas o globulinas de soja (Wolf y Briggs, 1956). Las proteínas que quedan en el sobrenadante se llaman proteínas del suero, y son proteínas biológicamente activas como inhibidores de tripsina, hemaglutininas, lipoxigenasas, β -glucosidasas, β -amilasas, fosfatasas, citocromo C (Fukushima, 1991 a).

Las globulinas de soja se dividen en cuatro fracciones de acuerdo a sus constantes de ultracentrifugación: 2S, 7S, 11S y 15S (Wolf 1970). También se clasifican por métodos inmunológicos en glicinina, α -conglucina, β -conglucina y τ -conglucina (Catsimpooulas y Ekenstein, 1969). La glicinina corresponde a la fracción 11S y la α -conglucina a la fracción 2S, de la clasificación de Wolf. La fracción 7S está formada por las globulinas β y τ conglucina y la globulina 7S básica (Tabla 1).

La β -conglucina ha sido identificada como el mayor componente de la fracción 7S. La τ -conglucina representa el 3% de las globulinas de soja mientras que el contenido de β -conglucina es 27.9% (Koshiyama y Fukushima, 1976). La τ -conglucina es un trímero de peso molecular 170 Kdal formado por tres subunidades iguales (Hirano y col 1987). La globulina 7S básica se distingue inmunológicamente de las otras globulinas 7S y se caracteriza por que se extrae con soluciones salinas (Yamauchi y col 1984). Recibe este nombre pues su punto isoeléctrico se encuentra entre 9.05-9.26. Está constituida por tres clases de polipéptidos cuyos pesos moleculares estimados son 45 Kdal; 28-29 Kdal (2 polipéptidos) y 17-18 Kdal (2 polipéptidos). Estos últimos polipéptidos se unen por uniones disulfuro formando una subunidad intermedia de peso molecular relativo 37 Kdal (Hirano y col 1987, Sathe y col. 1989 y George y de Lumen, 1991). Una de las características más importantes de esta proteína es su alta proporción de aminoácidos azufrados, que son los

aminoácidos limitantes de la soja.

Las fracciones 7S y 11S tienen una estructura cuaternaria compleja y una elevada tendencia a sufrir reacciones de asociación-disociación, un bajo contenido de α -hélice (Hermansson, 1978) y están compuestas principalmente por estructuras β -antiparalelas y random coil (Fukushima, 1968). Se caracterizan además por tener un alto contenido de ácido glutámico y aspártico; la globulina 7S tiene un contenido extremadamente bajo de triptofano y aminoácidos azufrados en relación a la fracción 11S. La presencia de grupos SH y uniones SS es de importancia porque estos residuos tienen mucha influencia en la funcionalidad. La globulina 7S posee un grupo SH y dos uniones disulfuro mientras que la 11S posee 2 grupos SH y 20 uniones SS por molécula (Fukushima, 1991 b).

Tabla 1: Proteínas mayoritarias del poroto de soja.

Fracción	Proteína total(%)	Componentes	Peso molecular (Da)
2S (α -conglucina)	22	Inhibidores de tripsina Citocromo C	8 000; 21 500 12 000
7S (β y τ -conglucina)	37	Hemaglutininas Lipoxigenasas β -Amilasas Globulina 7S	110 000 102 000 61 700 180 000-210 000
11S (glicina)	31	Globulina 11S	350 000
15S	11	-	600 000

(Wolf, 1970)

La forma 15S se origina por asociaciones de la glicina vía uniones disulfuro durante el aislamiento, lo mismo ocurre cuando aparece una forma 18S que proviene de asociaciones de la globulina 7S (Kilara y Sharkasi 1986)

Resumiendo podemos decir que los componentes mayoritarios del precipitado ácido de proteínas de soja son la globulina 11S o glicina y la globulina 7S o β -conglucina que representan el 34 y 27% de las proteínas presentes en el aislado, respectivamente (Iwabuchi

y Yamauchi, 1987 a y b), por lo que vamos a estudiar las características estructurales de las mismas.

3.1. Características estructurales de la globulina 7S o β -conglucina.

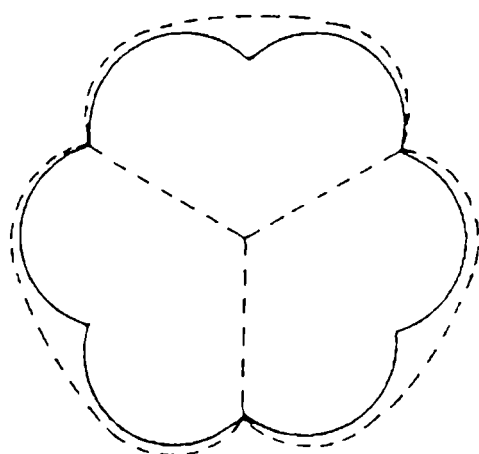
La globulina 7S o β -conglucina es una glicoproteína trimérica de peso molecular 140-170 Kdal formada por tres tipos de subunidades: α , α' , β (Thanh y Shibasaki 1976 a) cuyos pesos moleculares son 57-68; 57-72 y 42-52 Kdal, respectivamente. Una subunidad denominada τ de peso molecular relativo 42 Kdal copurifica con β . Las subunidades α y α' presentan una alta homología no sólo en sus regiones N terminal. Las subunidades β y τ también muestran homología con las subunidades α y α' de la β -conglucina (Hirano y col 1987). Se ha encontrado que la subunidad β está formada por cuatro componentes de puntos isoeléctricos entre 5.8-6.2 (β_1 - β_4), mientras que α y α' están formadas por un único componente de punto isoeléctrico 5.2 y 5.3 respectivamente (Lei y col 1983).

La estructura trimérica de la β -conglucina se encuentra completamente estabilizada a fuerzas iónicas superiores a 0.5M estando constituida por siete tipos diferentes de oligómeros: B_1 ($\alpha'\beta_2$); B_2 ($\alpha\beta_2$), B_3 ($\alpha\alpha'\beta$), B_4 ($\alpha_2\beta$), B_5 ($\alpha_2\alpha'$), B_6 (α_3) (Thanh y Shibasaki, 1976 a) y B_0 (β_3) (Yamauchi y col 1981 y Sykes y Gayler 1981). La estructura cuaternaria en estas condiciones de fuerza iónica se encuentra estabilizada por interacciones de tipo hidrofóbico. El descenso de la fuerza iónica provoca la disociación de las subunidades α y α' . La subunidad β no se disocia con la remoción de sales (Thanh y Shibasaki, 1979 y Doyle y col 1986). Las subunidades α y α' tienen una secuencia N terminal de 150 aminoácidos muy polar, lo que explicaría su disociación a baja μ . La subunidad β se caracteriza por la presencia de residuos hidrofóbicos (Doyle y col 1986). Se ha determinado que los residuos de fenilalanina de las subunidades de la β -conglucina se encuentran en un corazón hidrofóbico, mientras que los residuos de tirosina se encuentran en la interfase de las subunidades y que modificaciones en el pH o fuerza iónica provocan cambios conformacionales y reacciones de asociación y disociación que modifican el entorno de dichos residuos aminoacídicos (Kakalis y Baianu, 1990).

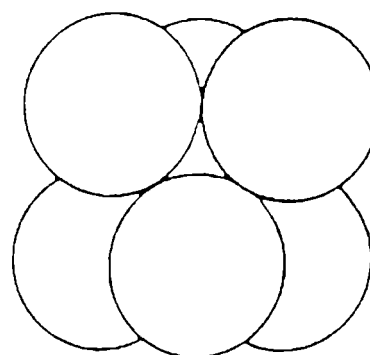
Los pesos moleculares de las subunidades α y α' son muy similares y dichas subunidades están inmunológicamente relacionadas. En cambio la subunidad β tiene una gran diferencia

de peso molecular ($\approx 20\ 000$ Dal) y carece de homología antigénica. Esta diferencia de tamaño se debe a la falta de un residuo de 174 aminoácidos en el extremo NH_2 -terminal, que como hemos visto es muy polar. Si se excluye este dominio se observa que entre las subunidades α' y β existe un 75% de homología. El dominio COOH -terminal de las tres subunidades está ampliamente conservado y es muy hidrofóbico, por lo que se lo considera importante en el mantenimiento de la estabilidad conformacional de las subunidades (Yamauchi y col 1991).

La estructura tridimensional de la β -conglucina ha sido estudiada por microscopía electrónica, aparece como discos planos de 8.5nm de diámetro y alrededor de 3.5nm de espesor (Plietz y col 1983 b) (**Figura 1**). Los patrones espectroscópicos de dicroísmo circular (DC) y de dispersión óptica rotatoria (ORD), sugieren que está compuesta principalmente de hojas β , con un bajo contenido de α -hélice (Wright, 1987).



Modelo del disco plano
de la estructura de la
globulina 7S



Modelo del antiprisma trigonal
de la estructura de la
globulina 11S

Figura 1: Modelo de estructura cuaternaria de las globulinas 7S y 11S (Plietz y col 1983 a y b, 1984).

Wright (1987, 1988) utilizando métodos de alineamiento de la secuencia de aminoácidos para maximizar homología comparó las secuencias de las globulinas 7S de poroto, de arveja y de soja y sugiere que están formadas por dominios alternantes conservados y variables:

cuatro conservados y cinco variables. Los dominios conservados I y III sugieren que el gen evolucionó por duplicación de un gen ancestral (Gibbs y col 1989).

3.2. Características estructurales de la globulina 11S o glicinina.

La globulina 11S tiene una estructura compleja estando constituida por subunidades no idénticas. Cada subunidad está compuesta por dos componentes polipeptídicos, uno con punto isoeléctrico ácido (A_n) (PM 30-40 Kdal) y el otro básico (B_n) (PM 18-22 Kdal). Estos polipéptidos están unidos por una unión disulfuro: A_n -S-S- B_n (abreviado como A-B) (Badley y col 1975; Kitamura y col 1976; Mori y col 1979; Staswick y col 1981, 1984). Los polipéptidos ácidos y básicos se encuentran codificados por un único gen, por lo que un único precursor proteico es sintetizado, el mismo sufre modificaciones post-traduccionales quedando la cadena polipeptídica dividida en dos partes que se unen covalentemente a través de una unión disulfuro en la molécula de glicinina (Tumer y col 1981, 1982; Barton y col 1982; Chrispeels y col 1982). Por lo tanto los componentes individuales ácidos y básicos de la glicinina son mal llamados polipéptidos ácidos y básicos, siendo las subunidades constitutivas de la glicinina pares ácidos-básicos (Yamauchi y col 1991). La molécula de globulina 11S es un hexámero formado por seis subunidades A-B.

La globulina 11S de soja tiene al menos siete subunidades diferentes, pero sólo cinco de estas subunidades están claramente definidas: $A_{1a}B_{1b}$, $A_{1b}B_2$, A_2B_{1a} , A_3B_4 y $A_5A_4B_3$ siendo sus pesos moleculares 58, 58, 58, 62 y 69 Kdal, respectivamente (Nielsen, 1984, 1985). El número y la posición de las uniones disulfuro entre los componentes polipeptídicos ácidos y básicos de cuatro de las cinco subunidades ha sido determinado por Staswick y col (1984). Solamente una unión disulfuro está comprometida en la unión de A y B de cada subunidad y las mismas se encuentran en posiciones análogas. Se trata del residuo de cisteína en la posición 7 a partir del NH_2 -terminal del polipéptido básico y el de la posición 90 a partir del NH_2 -terminal del polipéptido básico (Staswick y col 1984). La subunidad $A_5A_4B_3$ tiene una estructura inusual (Momma y col 1985). La misma es sintetizada como un único polipéptido pero el polipéptido ácido es clivado para producir dos polipéptidos: A_5 (97 residuos) y A_4 (257 residuos). El polipéptido A_5 proviene de la región NH_2 terminal del polipéptido ácido. La unión disulfuro entre los polipéptidos ácidos y básicos de $A_5A_4B_3$ es entre A_5 y B_3 , por

lo tanto el polipéptido A₄ no se encuentra unido covalentemente al básico.

La glicinina de soja proveniente de diferentes cultivares exhibe un gran polimorfismo en sus subunidades constituyentes (Mori y col 1981). Las mismas se han clasificado en cinco grupos por isoelectroenfoque. También exhiben heterogeneidad molecular (Utsumi y Mori, 1980; Mori y col 1981; Utsumi y col 1981). Por lo tanto la globulina 11S no es una única especie molecular. La estructura primaria de las globulinas 11S de diferentes plantas está ampliamente conservada (Nielsen y col 1989). De acuerdo con la homología de secuencias de aminoácidos las subunidades se clasifican en dos grupos (**Figura 2**). El grupo I está constituido por subunidades de tamaño uniforme ($PM \approx 58000$ Dal) que son relativamente ricas en metionina y que poseen aproximadamente un 90% de homología entre sí. Las subunidades del grupo II exhiben un nivel similar de homología pero contienen menos metionina y tienen mayor tamaño molecular (62000-69000 Dal) que el correspondiente al grupo I. La homología de secuencia entre miembros de distintos grupos es del orden del 60-70% (Yamauchi y col 1991).

Se han propuestos distintos modelos para explicar la estructura hexamérica de esta proteína. El modelo propuesto por Badley y col (1975) establece que las subunidades intermedias (A-B) se disponen en dos hexágonos, que se ubican uno sobre el otro formando un cilindro oblato hueco, existiendo tres pares A-B por hexágono. La interacción entre los pares A-B dentro del hexágono es a través de uniones hidrofóbicas. Los hexágonos se unen entre sí por fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno, la ubicación de A y B dentro del par se complementa. Estudios más recientes indican que la estructura es más compleja aceptándose en términos generales el modelo de un antiprisma trigonal (**Figura 1**), aunque existen algunas discrepancias entre el modelo y los datos experimentales (Miles y col 1985, l'Anson y col 1987) debido a la heterogeneidad de las especies moleculares (Utsumi y Mori, 1980, Mori y col 1981; Utsumi y col 1981) y el polimorfismo en la estructura primaria (Utsumi y col 1987).

Wright (1987, 1988), utilizando métodos de alineamiento de la secuencia de aminoácidos para maximizar su homología, comparó las secuencias de las subunidades de las globulinas 11S y sugirió que las mismas están compuestas por series alternativas de dominios conservados y variables: cuatro dominios conservados y cinco dominios variables. Los dominios variables se encuentran en zonas hidrofílicas lo que sugiere su localización en la

superficie de la molécula. Tres de los cuatro residuos de cisteína conservados que se presume forman uniones disulfuro intra e intercatenarias están ubicados en dominios constantes.

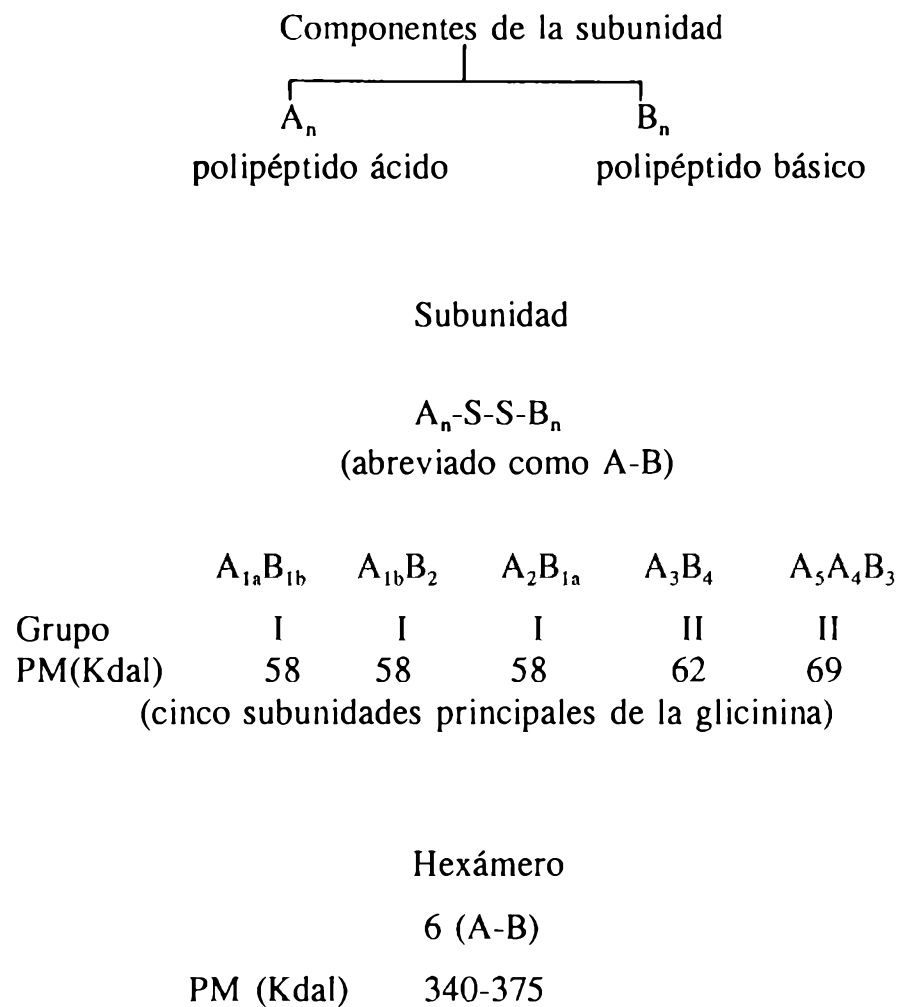


Figura 2: Estructura molecular de la globulina 11S o glicinina (Fukushima, 1991 b).

3.3. Comparación de las estructuras de las globulinas 7S y 11S.

Gibbs y col (1989) realizaron una comparación de las secuencias de aminoácidos de las globulinas 7S y 11S, sugiriendo que ambas globulinas derivan de un gen ancestral común. Esto es consistente con la existencia de regiones homólogas en ambas globulinas como las indicadas por Wright (1987, 1988).

Argos y col (1985) compararon las secuencias de aminoácidos de las globulinas 7S y 11S considerando las características conformacionales y tendencias (preferencias conformacionales en la estructura secundaria a formar hélices, giros u hojas; polaridad de los residuos,

hidrofilicidad e hidrofobicidad) de los aminoácidos. La predicción de estructura secundaria realizada a partir de los datos de secuencia, muestran que la glicinina y la β -conglucina poseen contenidos similares de α -hélice (25%), cadenas β (25%), giros β (42%) y ordenamiento al azar (8%), a pesar de que sus estructuras primarias no son similares. Las estructuras secundarias predichas a partir de este análisis se agruparon en tres dominios con rasgos estructurales comunes para las subunidades de la glicinina y la β -conglucina (**Figura 3**): el dominio NH_2 -terminal (dominio I), el dominio central (dominio II) y el dominio COOH -terminal (dominio III). El dominio COOH -terminal incluye la mitad terminal de todas las subunidades, es hidrofóbico y contiene una región central altamente conservada, la mitad de este dominio corresponde al polipéptido B. Las características físicas de este dominio sugieren que probablemente el mismo esté localizado dentro de la subunidad y juega un rol importante en el mantenimiento de la estructura. El dominio central es una mezcla de hélices y estructuras β plegadas, teniendo ambas globulinas la misma estructura secundaria. El dominio NH_2 -terminal está formado por los primeros 100-150 aminoácidos dependiendo de la subunidad. Este dominio es diferente en ambas globulinas y contiene la mayor proporción de α -hélice en relación a los otros dominios lo que sugiere una ubicación en la molécula externa. La diferencia más importante entre las globulinas 7S y 11S es una región hipervariable (inserto de hélice) localizada entre los dominios II y III en las subunidades de la globulina 11S. La longitud de esta zona hipervariable depende de la subunidad de glicinina de que se trate y es rica en aminoácidos ácidos. La diferencia de tamaño de las distintas subunidades de la globulina 11S se debe a la diferencia de tamaño de esta región. La globulina 7S es un trímero y la 11S un hexámero, por lo que es probable que las diferencias en el dominio I de estas globulinas sea la responsable de la diferencia de estructura cuaternaria.

4. Derivados proteicos de soja.

El cultivo de soja se remonta a más de 7000-10 000 años, en China. Su uso en Occidente se inicia aproximadamente en el año 1800 como una curiosidad. En 1920 se empieza a utilizar en la producción de aceite de soja para la elaboración de margarinas, aceite para freír, para ensaladas y shortenings. Reconocido su alto contenido de proteínas y su buen

valor nutricional, las mismas se usan, inicialmente, en alimentación de ganado, en 1950 empieza su uso en alimentación de bebés y en alimentos dietéticos. En los últimos 15 años comienza su aplicación en la formulación de alimentos debido a su bajo costo, disponibilidad, altas cualidades nutricionales y funcionales. La calidad nutricional de las proteínas de soja es sólo un poco menor que el de la mayor parte de las proteínas animales. Los aminoácidos limitantes son cistina y metionina. Los valores de relación de eficiencia proteica (PER) y de utilización proteica neta (UPN) son muy cercanos a los de la caseína, que es utilizada generalmente como proteína de referencia (Visser y Thomas, 1987).

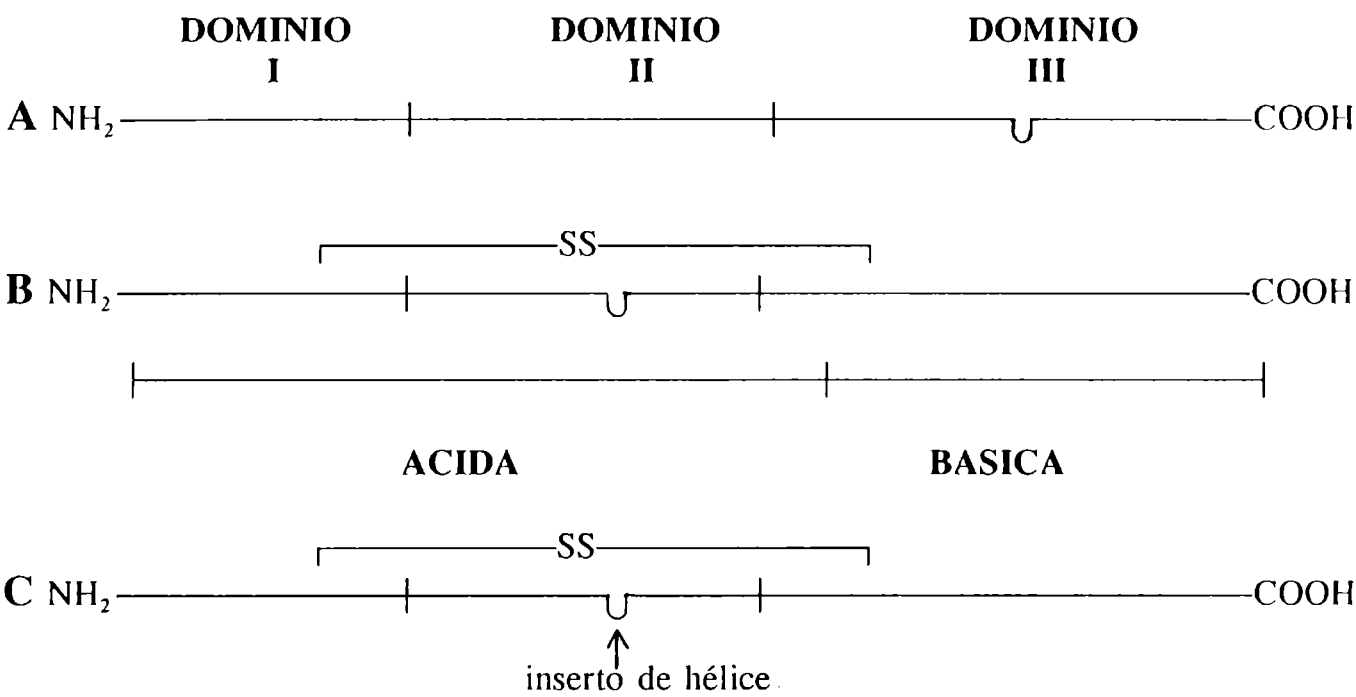


Figura 3: Relación de dominios predichos entre las globulinas 7S y 11S. **A** corresponde a la subunidad α' de la β -conglucina, **B** y **C** corresponden a las subunidades $A_{1a}B_{1b}$ y $A_3A_4B_3$ de la glicinina (Argos y col 1985).

Los porotos de soja tienen algunos factores indeseables. En primer lugar su sabor: los aceites de soja crudos se ponen rancios fácilmente, los fosfolípidos le dan sabor amargo y existen precursores en la fracción de carbohidratos que dan origen a los olores típicos del poroto, produciendo los llamados "off flavors", los cuales deben eliminarse o evitarse. En general se utilizan técnicas de refinación para producir derivados de proteínas de soja libres de estos componentes indeseables, lo que permite utilizarlos como ingredientes en elevadas

proporciones y en condiciones de proceso energéticas, por ejemplo pasteurización y esterilización. Por otro lado existen proteínas de bajo peso molecular que tienen actividad antitriptica, que pueden inactivarse por tratamientos térmicos. Otros factores como hemaglutininas y actividad goitrogénica y estrogénica que son térmicamente más sensibles que los inhibidores de tripsina, son más fáciles de eliminar. La actividad alérgica, que es inherente en todos los materiales proteicos, es comparativamente baja. Finalmente los oligosacáridos, la rafinosa y la estaquiosa causan flatulencia. Muchos de estos factores no son inherentes de la soja. Inhibidores de tripsina están presentes en otros productos alimentarios como arvejas, huevos y papas. Factores que producen flatulencia también se encuentran en porotos, nueces y cebolla. No obstante para que las proteínas de soja puedan ser aceptadas como componentes mayoritarios en alimentos, estos factores negativos deben ser eliminados o inactivados por técnicas de refinación adecuadas (Visser y Thomas, 1987).

Los métodos de refinamiento, en el cual estos factores indeseables son removidos son importantes en la preparación de productos tradicionales orientales de soja. En el "tofu" las proteínas son precipitadas por adición de sales de calcio, quedando los oligosacáridos en el suero. En la preparación del "miso" los azúcares son eliminados en el proceso de fermentación. La refinación por fermentación también se utiliza en la preparación de la salsa de soja y "tempeh". En la preparación de la leche de soja los porotos se maceran con agua y el extracto obtenido que posee oligosacáridos y fosfolípidos se descarta (Visser y Thomas, 1987).

Las técnicas de refinación originales y los productos obtenidos no son adecuados para los hábitos de consumo occidentales, por lo que se utilizan otras técnicas de refinación como son, por ejemplo, la obtención de aislados y concentrados de proteínas (**Figura 4**). Las condiciones de proceso deben ser tales que: 1) se extraigan componentes no proteicos; 2) se remuevan componentes causantes de sabor y olor desagradables; 3) se remuevan o inactiven factores antinutricionales y 4) que den origen a un material proteico adecuado para su aplicación en productos alimentarios (Visser y Thomas, 1987).

Los derivados proteicos de soja se dividen en tres grupos de acuerdo a su contenido de proteínas: harinas de soja, concentrados y aislados proteicos de soja; a partir de los cuales varios tipos de productos se forman de acuerdo a su textura: polvos, granulados y fibrosos.

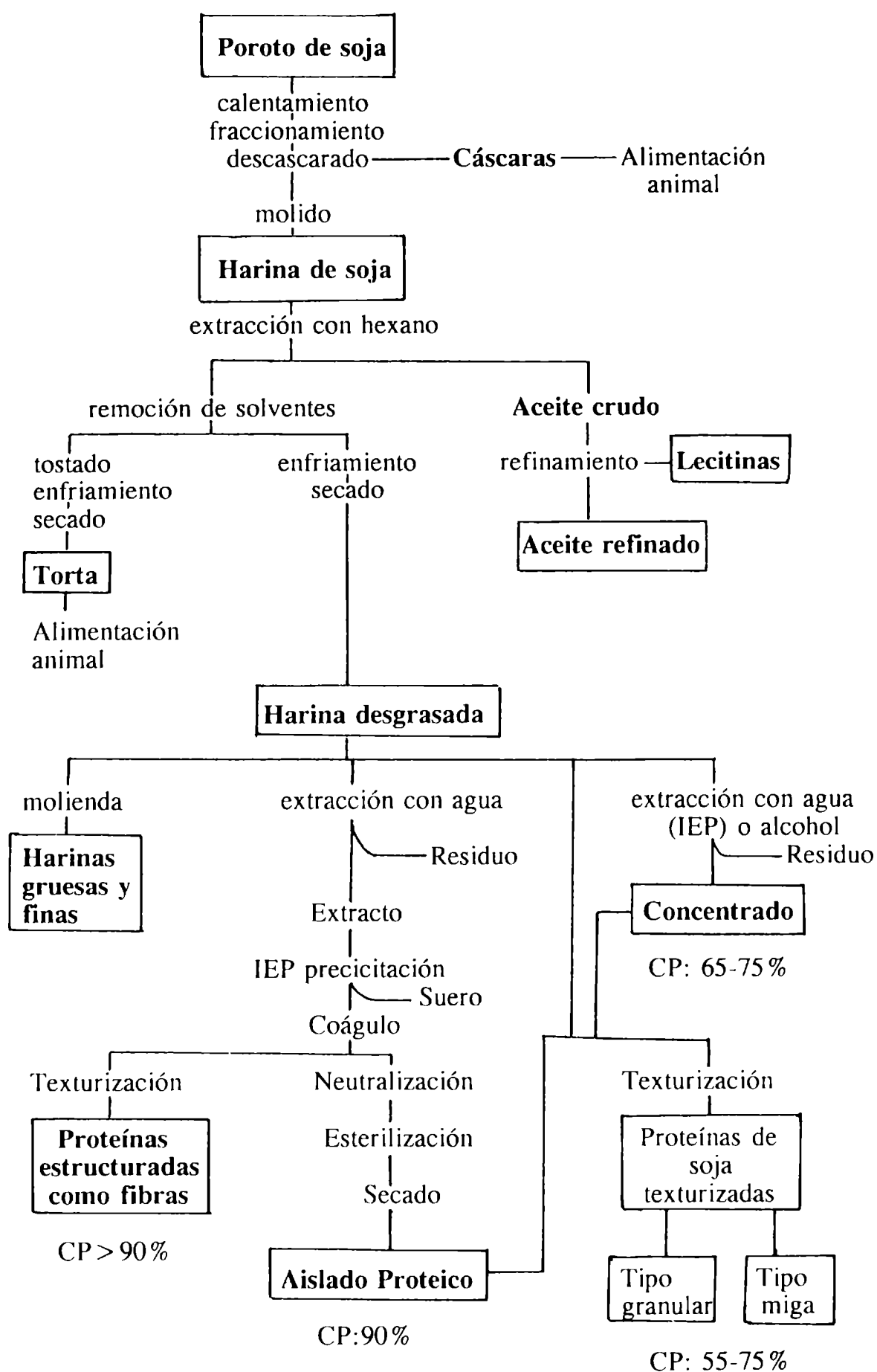


Figura 4: Procesamiento del poroto de soja. IEP, punto isoeléctrico; CP, contenido proteico. (Visser y Thomas, 1987 y Fukushima, 1991 a).

Estos productos se usan como ingredientes alimentarios debido a su amplia gama de propiedades funcionales y debido a que son una fuente económica de proteínas. Por ejemplo los aislados de proteína de soja tipo polvo se usan en salchichas y sopas como emulsionantes; en sopas y salsas como mejoradores de la viscosidad, en productos de pescados tipo pastas como el kamaboko como ligantes, en panes y tortas para absorber agua. Los texturizados de proteínas de soja de tipo granular se usan en hamburguesas y en otros productos cárneos de picado grueso para la absorción de jugo y retención de grasa (Fukushima, 1991 a). Las harinas no desgrasadas de soja se utilizan en panes para mejorar la calidad de la miga y el color, ya que por acción de la lipoxigenasa se oxidan pigmentos de la harina. Los productos de soja con alto contenido de proteína de soja mejoran la textura de rellenos de ravioles, tarteletis y lasagnas. También se utilizan para reemplazar las proteínas del huevo y de la leche en productos de confitería y chocolatería, helados y margarinas; por ejemplo los hidrolizados de proteínas de soja confieren propiedades espumantes similares a las de la albúmina de huevo (Visser y Thomas, 1987).

Durante el proceso de obtención de aislados y concentrados las proteínas son sometidas a fraccionamientos, modificaciones químicas, físicas y enzimáticas para cambiar y mejorar su funcionalidad y por lo tanto su aplicabilidad en bebidas, embutidos, salsas, tortas, blanqueadores de café, mayonesas, aderezos, cremas congeladas, mousses, panes, productos lácteos, etc (Kinsella, 1979; Visser y Thomas, 1987).

5. Propiedades funcionales.

Las propiedades funcionales son aquellas propiedades fisicoquímicas que determinan que una proteína pueda ser utilizada como ingrediente de un alimento, debido a que es capaz de impartirle características deseadas, ya sean estructurales como organolépticas. Las proteínas forman parte de estructuras alimentarias complejas y es importante el conocimiento específico de su función como ingredientes. Propiedades como solubilidad, capacidad de hinchamiento, viscosidad, textura, absorción de agua y grasa, capacidad de emulsificación, de espumado y de gelificación son de interés general (Kinsella, 1979; Hermansson, 1979).

El camino más tradicional para testear un nuevo ingrediente, es probar directamente el mismo en varios tipos de alimentos. Estas pruebas consumen tiempo y luego de mucho

usarlas se tornan ineficientes y caras. Presentan un gran número de desventajas: requieren grandes cantidades de material crudo, dan información limitada acerca de la función del ingrediente investigado, cambios pequeños en las condiciones de proceso pueden producir grandes efectos inesperados en el producto final y además resulta difícil controlar el contenido final de agua y grasa del producto terminado, sin un apropiado conocimiento de la función de los ingredientes (Hermansson, 1979).

Tabla 2: Propiedades funcionales proteicas que intervienen en los diversos alimentos.

Alimento	Propiedades funcionales
Bebidas	Solubilidad a pH diferentes, estabilidad al calor, viscosidad.
Potajes, salsas	Viscosidad, emulsificación, retención de agua.
Masa de panadería	Formación de una matriz y de una película que tenga propiedades de viscoelasticidad, cohesión, desnaturalización por calor, gelificación.
Productos de panadería y de pastelería	Absorción de agua, emulsificación, espumado, pardeamiento.
Productos lácteos (por ej. queso fundido, helados, postres)	Emulsificación, retención de materia grasa, viscosidad, espumado, gelificación, coagulación.
Reemplazantes de huevo	Espumado, gelificación.
Productos cárnicos (por ej. salchicha)	Emulsificación, gelificación, cohesión, absorción y retención de agua y materia grasa.
Productos similares a la carne (por ej., proteínas vegetales extrusionadas)	Absorción y retención de agua y materia grasa, insolubilidad, firmeza, masticabilidad, cohesión, desnaturalización por calor.
Recubrimientos de alimentos	Cohesión, adhesión.
Productos de confitería y chocolatería (por ej. chocolate con leche)	Dispersabilidad, emulsificación.

(Cheftel, 1989).

Tabla 3: Propiedades funcionales de proteínas de soja en sistemas alimentarios reales.

Propiedad funcional	Sistema alimentario	Forma de uso
Solubilidad	Bebidas	Harinas, concentrados, aislados, hidrolizados.
Absorción y unión de agua	Productos cárneos, salsas, tortas y panes.	Harinas, concentrados.
Viscosidad	Sopas	Harinas, concentrados, aislados.
Gelación	Coágulos, quesos, carnes.	Concentrados, aislados.
Adhesión-cohesión	Carnes, salsas, pastas, panes.	Harinas, concentrados, aislados.
Elasticidad	Carnes, panes.	Aislados.
Emulsificación	Sopas, tortas, salsas	Harinas, concentrados, aislados.
Absorción de grasa	Carnes, salsas.	Harinas, concentrados, aislados.
Unión de flavor	Símil carnes, panes.	Harinas, concentrados, hidrolizados.
Espumado	Coberturas batidas, tortas.	Aislados, hidrolizados.
Control de color	Panes	Harinas.

(Kinsella, 1979).

Para obtener la información necesaria para elegir y manipular ingredientes proteicos se deben realizar estudios sistemáticos en sistemas modelos simples. Con un sistema modelo la función de los ingredientes proteicos se estudia más fácil y el número de test en gran escala se reducen. Además es necesario conocer en estados tempranos qué propiedades son importantes para ciertas aplicaciones (Hermansson, 1979).

En la **Tabla 2** se enumeran algunas de las propiedades funcionales que son importantes para la elaboración de diferentes alimentos y en la **Tabla 3** algunas de las propiedades funcionales de los distintos derivados de proteínas de soja junto con sus aplicaciones en sistemas reales. Estas propiedades varían con la temperatura, concentración de proteína,

fracción proteica y con las condiciones de pH, fuerza iónica y constante dieléctrica del medio. También son afectadas por el tratamiento, interacción con otras macromoléculas, por las condiciones de proceso y por modificaciones por métodos físicos, químicos y enzimáticos (Kinsella, 1979).

Las funciones básicas de varios ingredientes pueden ser utilizadas como un indicativo de su comportamiento en el producto final, pero en muchos casos es inevitable un ensayo final bajo condiciones prácticas.

Las propiedades funcionales pueden clasificarse en tres grupos: propiedades de hidratación (dependientes de la interacción proteína-agua), propiedades que están relacionadas con la interacción proteína-proteína y propiedades de superficie. En el primer grupo se encuentran propiedades como por ejemplo la retención y absorción de agua, adhesión, solubilidad, dispersibilidad, humectabilidad y viscosidad. En el segundo grupo intervienen fenómenos tales como la precipitación, gelificación y formación de otras estructuras diferentes (fibras y pastas proteicas). Las propiedades de superficie dependen de la capacidad de la proteína de difundir a la interfase (ya sea agua-aire o agua-aceite) y formar un film estable como son las propiedades emulsionantes y espumantes. Estos grupos no son totalmente independientes; por ejemplo, la gelificación no solamente implica interacciones proteína-proteína, sino también las interacciones proteína-agua; la viscosidad y solubilidad dependen, una y otra de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína (Cheftel, 1989).

La solubilidad o dispersibilidad es una propiedad funcional importante que está relacionada con otras propiedades funcionales ya que por ejemplo es una condición necesaria para que la proteína sea capaz de actuar como agente emulsionante o espumante. Generalmente se determina como una medida de la misma el índice de dispersibilidad proteica (PDI) y el índice de solubilidad medido como nitrógeno (NSI) de acuerdo a lo sugerido por los métodos oficiales de la AOCS; aunque estos valores se encuentran sujetos a varias fuentes de variación tales como pH, capacidad buffer, velocidad de agitación y de centrifugación empleadas en su determinación, lo que dificulta la estandarización del método de medida. Además decrece con el tiempo de almacenamiento, probablemente debido a la formación de uniones disulfuro. Otras propiedades que juegan un papel importante en la funcionalidad son la humectabilidad, la capacidad de adsorción y de unión de agua. La adsorción de agua se define como el agua absorbida por un polvo proteico seco después de

que se equilibró contra vapor de agua a una humedad relativa conocida. La absorción de agua se refiere al agua que es retenida por el producto luego de una filtración o una centrifugación. La absorción de agua puede deberse a que una partícula proteica se hincha incorporando agua o lo hace a través de la interacción con otras partículas, también puede deberse a la capacidad de formar un gel durante el proceso. Los métodos existentes para evaluar capacidad de unión de agua deben interpretarse con cuidado ya que pueden evaluar los diferentes mecanismos de unión de agua. Además para muchas aplicaciones puede ser importante el conocimiento de la cantidad de agua retenida luego de un tratamiento térmico (Visser y Thomas, 1987). Uno de los métodos que se utilizan para medir la capacidad de absorción de agua es el método de Fleming y col (1974), que consiste en preparar dispersiones de proteína al 10 %, centrifugar y medir la disminución del volumen del líquido libre, el cual se toma como una medida de la capacidad de absorción de agua. Este método tiene limitaciones serias ya que si el material utilizado es soluble en agua no habrá absorción aparente. Haciendo una corrección del método de Fleming teniendo en cuenta la cantidad de proteína disuelta es posible evaluar la capacidad de absorción de agua contra una fuerza centrífuga, que puede ser baja o alta, utilizándose la denominación de capacidad de retención de agua (WHC) para identificar el agua absorbida cuando se emplea este método. Otra forma de medida es utilizando el aparato de Baumann, bajo estas condiciones la proteína absorbe agua contra la fuerza de gravedad, empleándose el término imbibición para identificar este proceso (WIC). El término hinchamiento se utiliza para la toma espontánea de agua por un sólido (Hermansson, 1972).

La capacidad de absorción de grasa de un producto está relacionada con su contenido de proteínas, es independiente de las propiedades emulsionantes. Se mide por adición de un exceso de aceite a la proteína, mezclado, centrifugación y pesado del aceite. El mecanismo de absorción ensayado de esta manera es primariamente un atrapado físico del aceite.

Las propiedades de gelificación dependen de las características estructurales de la proteína junto con las condiciones utilizadas para lograr la desnaturalización y posterior gelificación, tales como velocidad de calentamiento y enfriamiento, pH, temperatura, concentración de proteína, concentración y tipo de ión presente, interacciones con otros componentes. Los geles proteicos están formados por una red tridimensional continua, en los que las interacciones intermoleculares involucradas son múltiples tales como uniones

disulfuro, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La gelificación tiene un papel fundamental en la preparación de numerosos alimentos tales como productos lácteos, geles de gelatina, clara de huevo coagulada, diversos productos calentados a base de carne o pescado, geles proteicos de soja, proteínas vegetales texturizadas por extrusión y las pastas de panadería (Cheftel, 1989).

La habilidad de una proteína para actuar como agente emulsionante y espumante depende tanto de su velocidad de migración a la interfase como de su capacidad de formar un film estable pero los requerimientos estructurales son diferentes si desea que actúe como agente espumante o emulsionante.

El proceso de formación de espumas es más lento que el de una emulsión ya que el aire se va incorporando gradualmente a medida que se produce la migración de las moléculas hacia la interfase y la reducción de la tensión superficial por la desnaturalización parcial de la proteína en la interfase (Dickinson y Galazka, 1991). Durante el período en que se incorpora el aire se da tiempo suficiente para que la molécula proteica se desenrolle y forme un film coherente y continuo, hecho que no ocurre durante una emulsificación. Otra diferencia es que existe un exceso de fase dispersa (aire) y que el proceso de formación incluye ruptura (Halling, 1981). Además para que se forme una lamela estable es necesario que no haya repulsiones electrostáticas entre los componentes del film (Poole, 1989); cuanto más estructurada sea la proteína más rígido y cohesivo será el film (Graham y Phillips, 1979 a,b y c).

Los requerimientos estructurales para que una molécula sea un buen agente espumante son en primer lugar que sea soluble, pequeña y flexible para que pueda absorberse rápidamente a la interfase y cubrir la superficie recién formada. Además debe interactuar inmediatamente con las moléculas adyacentes para formar un film estable. Para cumplir con estos dos requisitos debe ser anfifílica y estructuralmente dinámica (German y col 1985). Cuando se evalúa la capacidad de formación de espuma se mide la habilidad de la proteína para absorberse y desenrollarse rápidamente en la interfase. Esta primariamente relacionada con su coeficiente de difusión, generalmente proteínas pequeñas difunden más rápidamente a la interfase, la superficie es cubierta rápidamente por una fina capa de proteína. La subsecuente asociación de las proteínas a la interfase está relacionada con su habilidad para adsorberse e insertarse en un film preexistente impidiendo la ruptura de la integridad del film

por interacciones repulsivas. Una proteína idealmente adecuada para formar espumas debe ser relativamente pequeña, flexible y con una significativa hidrofobicidad expuesta. Esto facilita la orientación y adsorción en la interfase. En cambio la estabilidad de la espuma depende de las propiedades reológicas y adhesivas del film alrededor de las burbujas del gas, que determinan la resistencia de la lamela a drenar y de las burbujas a colapsar. Las propiedades físicas de la membrana del film están determinadas por las propiedades estructurales y conformacionales de la proteína: superficie topográfica, fuerza mecánica, viscoelasticidad y capacidad de absorción de agua. Estas propiedades requieren que la proteína retenga cierta estructura secundaria y terciaria en la interfase. Proteínas con mayor peso molecular exhiben mayor fuerza del film y estabilidad de la espuma. Proteínas con carga neta mínima poseen mejor estabilidad espumante y condiciones que minimizan la carga tienden a aumentar la estabilidad. Parece paradójico que se requiere que la proteína se desenrolle rápidamente en la interfase y que retenga considerablemente su estructura secundaria y terciaria en la interfase; por lo que existe un balance crítico entre formación y estabilización del film.

La habilidad de una proteína para actuar como agente espumante, por lo tanto puede caracterizarse por medidas de poder espumante que es la cantidad de espuma producida después de incorporar un cierto volumen de aire o gas y por medidas de estabilidad de la espuma a través de su permanencia en función del tiempo. Como medidas de poder espumante pueden utilizarse distintos parámetros, los más empleados son el volumen de espuma producido luego de un período de tiempo fijo de batido (overrun) y la cantidad de líquido que se incorpora a una espuma que es una medida indirecta de la distribución del tamaño de burbujas. Como medidas de estabilidad pueden utilizarse disminución del volumen de espuma o drenaje de líquido con el tiempo.

Entre los métodos de ensayo para medir capacidad de formación de espumas se encuentran los que incorporan aire por batido, burbujeo y agitación. El batido requiere de soluciones concentradas de proteína; se utiliza el overrun y el tiempo requerido para lograr un volumen máximo de espuma evaluándose la habilidad espumante de distintas proteínas, por su capacidad de incorporar el aire en forma de una distribución fina de burbujas, que está determinada por su actividad superficial. La distribución del tamaño de burbuja se mide colocando inmediatamente la espuma formada en un portaobjeto registrándola con una

videocámara. Una descripción completa de la espuma se tiene conociendo la distribución de tamaño de burbuja y las dimensiones de la lamela. Debido a que este método requiere grandes cantidades de muestra se reemplaza por otros métodos por ejemplo aquellos en que se incorpora aire por burbujeo. Se deja pasar aire a través de una solución observándose el desarrollo de una columna de espuma. La densidad de la espuma, que es inversa al overrun correlaciona con la actividad espumante. En los métodos de batido la agitación es continua por un período de tiempo fijo y la proteína debe ser capaz de estabilizar rápidamente el film produciéndose así un gran número de burbujas y por lo tanto la incorporación de un volumen mayor de aire (baja densidad = alto overrun). Cuando se burbujea se introduce una cantidad fija de aire y la proteína con mayor capacidad espumante es capaz de estabilizar estas burbujas más rápidamente. Dado que el colapso de las burbujas y el drenaje de la fase líquida que rodea al film es menor cuanto menor es el tamaño de burbuja, el volumen de espuma es constante y la cantidad de solución retenida por la espuma, es una medida de la habilidad espumante (a mayor densidad menor overrun) (método de Waniska y Kinsella, 1979).

La estabilidad se puede medir por modificaciones en la distribución del tamaño de burbuja en función del tiempo, que produce reducción de la altura de la espuma si se trata de una espuma muy inestable, pero habitualmente se sigue a través del drenaje de líquido de la espuma.

Las propiedades emulsionantes de una proteína dependen de dos factores: a) capacidad de reducir la tensión interfacial debido a su adsorción a la interfase; b) capacidad de formar un film que actúe como barrera electrostática, estructural y mecánica. La formación de una emulsión depende de una rápida adsorción, desenrollamiento en la interfase y reorientación. Mientras que la estabilidad está determinada por la reducción de la energía libre interfacial y por las propiedades reológicas del film que están determinadas por el grado de hidratación e interacciones intermoleculares (Damodaran, 1989)

Los métodos que habitualmente se utilizan para medir las propiedades emulsionantes de una proteína sólo caracterizan alguna de estas propiedades de ahí la necesidad del empleo de más de un método. En la determinación del índice de actividad emulsionante (método de Pearce y Kinsella, 1978) se evalúa fundamentalmente la habilidad de la proteína para lograr la dispersión de la fase aceite y proveer rápidamente una cubierta suficiente en el área interfacial que evite la coalescencia inmediata, ya que la emulsión es bloqueada en una etapa

inicial por el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS) y no se da tiempo suficiente para la penetración y reordenamiento en la interfase. En cambio cuando se realizan determinaciones de capacidad emulsionante (método de Swift y col 1961) además de adsorción se determina la resistencia mecánica del film ya que el sistema está sometido a una deformación continua. La medida de desestabilización por el método de Dagorn Scaviner y col (1987), evalúa los procesos de floculación y cremado, y en cierta medida coalescencia cuando no se cubrió completamente el film de proteína durante la homogeneización, esta desestabilización depende de la diferencia de viscosidad entre ambas fases, de la capacidad de hidratación, carga eléctrica y viscoelasticidad del film. Para que no ocurra coalescencia es necesario que la superficie interfacial esté completamente cubierta por la proteína por consiguiente se está evaluando también la velocidad de adsorción. Al evaluar estabilidad por el método de centrifugación se evalúa fundamentalmente la resistencia mecánica del film.

6. Relación entre propiedades funcionales y estructurales.

Muchas aplicaciones de proteínas en alimentos se basan en observaciones empíricas y en comparaciones con sus funciones bioquímicas, existiendo un conocimiento muy limitado de la relación entre propiedades funcionales y estructurales de la proteína como ingrediente. La elucidación de esta relación y el efecto de fuerzas estabilizadoras en el comportamiento funcional es necesaria para una modificación racional de las proteínas, por métodos físicos, químicos y enzimáticos y por ingeniería genética, ya sea para mejorar o estabilizar su comportamiento en aplicaciones específicas (Kinsella y Phillips, 1989). Por otro lado el conocimiento de la relación estructura-función permitirá predecir el comportamiento funcional a partir de parámetros que den cuenta de la estructura y aplicar las técnicas del QSAR (quantitative structure-activity relationship) para la optimización de las formulaciones alimentarias (Nakai y col 1991).

La viscoelasticidad del gluten; la anfipaticidad de las caseínas, las propiedades estructurales de las miofibrillas y la tendencia del colágeno y la gelatina a formar geles/redes, reflejan diferencias en su estructura primaria y en su comportamiento de plegamiento (por ej., modificaciones conformacionales e interacciones proteína-proteína) (Kinsella y Phillips, 1989). Las propiedades hidrodinámicas de las proteínas como la capacidad de gelación y

viscosidad, están fundamentalmente determinadas por el tamaño y forma de la molécula proteica, mientras que la mayor parte de las propiedades de superficie activa como son emulsificación, espumado, unión de aromas y de lípidos, están más influenciadas por la composición y distribución de aminoácidos y por la flexibilidad molecular que por el tamaño y forma de la molécula (Damodaran, 1989). La cuantificación de estas diferencias a través de parámetros estructurales es de interés.

Tabla 4: Parámetros estructurales utilizados para predecir funcionalidad.

Propiedades estructurales	
Parámetros eléctricos	Carga neta
	Carga superficial
Hidrofobicidad	Superficial
	Expuesta
Parámetros estéricos	Tamaño molecular
	Flexibilidad molecular
	Contenido de SH/SS

Las técnicas del QSAR usan datos de estructura molecular y propiedades físicas para hacer predicciones de la actividad o reactividad de los componentes. En sistemas sencillos o para moléculas pequeñas, el conocimiento de la hidrofobicidad, de parámetros estéricos y eléctricos permite hacer cálculos de QSAR. En cambio para proteínas la cuantificación de estos parámetros y su relación con el comportamiento funcional en sistemas alimentarios, como por ejemplo habilidad para formar y estabilizar emulsiones y espumas, para gelificar y coagular, para formar films o para unir lípidos, etc., es más complicado y sólo es posible determinar algunos parámetros que dan una información parcial ya que no reflejan la complejidad de las proteínas alimentarias en términos de coexistencia de varios tipos de proteínas y cambios inducidos por el proceso. En lugar de estos parámetros se utilizan "medidas empíricas" de parámetros relacionados con la carga, con la hidrofobicidad y con efectos estéricos (**Tabla 4**). Por ejemplo la solubilidad es un reflejo del balance de carga y de la hidrofobicidad de la molécula proteica, que afectan la interacción con el solvente

(→"soluble") y la interacción con otras moléculas (→"insoluble"). La medida de la solubilidad para hacer un análisis del QSAR provee indirectamente información del efecto de la carga y de la hidrofobicidad. Otros ejemplos de parámetros utilizados para predecir la funcionalidad de las proteínas en alimentos son la viscosidad, que refleja efectos estéricos e interacciones intermoleculares, y el contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales que son indicativos de la flexibilidad molecular y de la capacidad de producir entrecruzamiento (Nakai y col 1991).

En la **Tabla 5** se muestran algunas ecuaciones que describen la relación entre descriptores fisicoquímicos (solubilidad, hidrofobicidad, viscosidad, contenido de sulfhidrilos libres y uniones disulfuro) y funcionalidad (actividad emulsionante, capacidad de espumado, coagulación y gelación inducidos por calor y capacidad de unión de lípidos) de algunas proteínas. Estas ecuaciones muestran que la hidrofobicidad es un parámetro importante para explicar muchas de las propiedades funcionales de las proteínas. De la comparación de las ecuaciones para predecir coagulabilidad y fuerza del gel de soluciones de ovoalbúmina a concentraciones de 0.5% y 5%, surge que la importancia relativa de los parámetros fisicoquímicos para describir la funcionalidad es dependiente de la concentración. La hidrofobicidad medida con ANS y la frecuencia de carga expresada como potencial zeta (ZP) son importantes para predecir la coagulabilidad inducida por calor de soluciones 0.5% de ovoalbúmina, mientras que la hidrofobicidad determinada con ANS y el contenido de grupos sulfhidrilos libres son importantes para explicar la fuerza del gel de soluciones de ovoalbúmina calentadas a una concentración de 5%. Similarmente, la actividad emulsionante de proteínas solubles es dependiente de la concentración de la solución proteica; a concentraciones cercanas a cero, la actividad emulsionante, expresada como turbidez de la emulsión (A_{500}), correlaciona con la hidrofobicidad determinada con CPA de las proteínas (ecuación 1); no obstante a concentraciones de 2.5% o mayores cobra importancia un parámetro que describe la interacción entre hidrofobicidad determinada con CPA y viscosidad de la fase continua (ecuación 2):

$$A_{500} = 0.387 + 8.391 \text{ CPA} \quad (r=0.932, P<0.05) \quad (1)$$

$$A_{500} = 0.382 + 16.52 \eta_0^2 \text{ CPA}^{1/2} \quad (r=0.922, P<0.05) \quad (2)$$

La medida cuantitativa de parámetros fisicoquímicos relevantes es crucial para la aplicación de las ecuaciones del QSAR para explicar y para predecir la funcionalidad de proteínas. Por ello se han establecido métodos para medir algunos de ellos tales como solubilidad, viscosidad, hidrofobicidad, carga neta, contenido de grupos sulfhidrilos libres y uniones disulfuro, etc. La medida de la hidrofobicidad refleja el número y tamaño relativo de sitios hidrofóbicos expuestos en la superficie de la proteína. Se han propuesto varios métodos para su determinación tales como métodos de partición en solventes polares y no polares; combinación de algoritmos de los valores de hidrofobicidad de los aminoácidos y medidas de hidrofobicidad por unión de SDS, ANS, CPA o DPH a la proteína. Este último método se basa en que la unión de una sonda a la proteína produce un incremento de la fluorescencia y un corrimiento de la longitud de onda de máxima emisión hacia el azul. Tanto el incremento de la fluorescencia como la ubicación del máximo son característicos de la proteína (Cardamone y Puri 1992). Con ANS se mide hidrofobicidad aromática y con CPA hidrofobicidad alifática. El ácido cis-parinárico (CPA) es mejor que el ANS ya que se parece más a un lípido, pero al igual que el ANS tiene carga lo que puede interferir en el pegado de la sonda a la proteína o cambiar la estructura de la misma. El DPH es no polar por lo que no presenta estos inconvenientes (Hayakawa y Nakai, 1985 a y b; Nakai y col 1991; Li-Chan y Nakai 1991). De esta manera se determinan la hidrofobicidad superficial de la proteína que es un parámetro que permite predecir propiedades emulsionantes (Kato y Nakai, 1980). En cambio la capacidad espumante correlaciona mejor con la hidrofobicidad promedio determinada por el método de Bigelow (1967) o la hidrofobicidad total o expuesta determinada por desnaturalización de la proteína por tratamientos térmicos en presencia de SDS (S_c) (Townsend y Nakai, 1983). Propiedades como gelación y coagulación también correlacionan mejor con la hidrofobicidad expuesta (Voutsinas y col 1983 b) (**Tabla 5**).

Kato (1991) ha estudiado otros factores que inciden en la funcionalidad de proteínas con el fin de establecer nuevas relaciones estructura-función. Analizó modificaciones en el grado de asociación-disociación, en la carga y en la estabilidad conformacional de la proteína. Determinó que un incremento en el grado de asociación proteica es un factor importante para el incremento en la capacidad de formar espumas, como lo demuestran por ejemplo el efecto de la sonicación o la reducción sobre la ovomucina (polímero de peso molecular 8300 Kdal) que causan una disociación del polímero y una disminución de su poder espumante; o el

Tabla 5: Ejemplos de ecuaciones que describen relaciones entre descriptores fisicoquímicos y funcionalidad de algunas proteínas alimentarias.

Propiedad funcional	Ecuación
Indice de Actividad Emulsionante (IAE) de proteínas nativas y calentadas.	IAE = $16.9 + 0.21\text{CPA} + 0.93s - 0.007s^2$ (n=52, $R^2=0.583$, $P<0.001$) (Voutsinas y col 1983 b)
Indice de Estabilidad Emulsionante (IEE) de proteínas nativas y calentadas.	IEE = $-69.5 + 0.565 \text{ CPA} + 2.03s - 0.004 \text{ CPA } s - 0.012 s^2$ (n=49, $R^2=0.584$, $P<0.001$) (Voutsinas y col 1983 b)
Capacidad de retención de grasa (FBC) de proteínas nativas y calentadas.	FBC = $4.9 + 0.45\text{CPA} + 1.40s - 0.001\text{CPA}^2 - 0.014s^2$ (n=48, $R^2=0.473$, $P<0.001$) (Voutsinas y col 1983 b)
Capacidad de espumado (CE) de proteínas nativas.	$\ln(\text{FC}+30) = 0.039 + 0.0041\text{H}\phi_{\text{w}}$ (n=11, $r^2=0.677$, $P<0.01$) o $\text{FC} = -1775 + 0.1493\eta + 25.93 \ln S_e$ (n=19, $R^2=0.779$, $P<0.01$) (Townsend y Nakai 1983)
Absorción de agua (AM_b) de carne picada en salmuera.	$\text{AM}_b = -0.26 + 0.0021\text{CPA} - 0.0000017\text{CPA}^2$ (n=58, $R^2=0.439$, $P<0.001$) (Li-Chan y col 1987)
Coagulabilidad (C) de soluciones 0.5 % de ovoalbúmina nativa y calentada.	$C = -4.77 + 0.476\text{ANS} - 0.000404 \text{ ANS}^2 - 0.0137 \text{ ANS ZP}$ (n=26, $R^2=0.794$, $P<0.001$) (Hayakawa y Nakai 1985 a)
Fuerza del gel (G) de soluciones 5.0% de ovoalbúmina calentada.	$G = 821 - 0.0628\text{ANS} - 8.91 \text{ SH}$ (n=26, $R^2=0.621$, $P<0.001$) (Hayakawa y Nakai 1985 a)

Abreviaturas utilizadas:

ANS = hidrofobicidad superficial determinada con el ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (ANS).

CPA = hidrofobicidad superficial determinada con el ácido cis-parinámico (CPA).

S_e = hidrofobicidad determinada con el ácido cis-parinámico (CPA) después de un calentamiento en presencia de SDS.

$\text{H}\phi_{\text{w}}$ = hidrofobicidad promedio calculada de acuerdo con el método de Bigelow (1967).

η = viscosidad.

SH = contenido de grupos sulfhidrilos.

ZP = carga neta determinada como potencial zeta.

efecto de tratamientos térmicos en las propiedades espumantes de la ovoalbúmina que producen agregación y un mejoramiento de las mismas. La disminución en la carga de la proteína, por ejemplo por remoción de restos de ácido siálico de la ovomucina, produce un mejoramiento de las propiedades espumantes (el film formado es más fuerte ya que se reducen repulsiones electrostáticas) y un empeoramiento de las emulsionantes; en cambio la deamidación que provoca un incremento de carga produce el efecto opuesto (mejora las propiedades emulsionantes pues reduce la tendencia de las gotas de aceite a coalescer por el incremento de la carga). La estabilidad proteica es otro factor importante cuando se estudian propiedades de superficie, ya que la proteína debe ser capaz de orientar sus restos hidrofílicos e hidrofóbicos en la interfase produciendo una disminución de la tensión interfacial. Modificaciones en la energía libre de desplegamiento de la proteína por mutagénesis dirigida de un único aminoácido, correlacionan con modificaciones en la reducción de la tensión interfacial; siendo esta correlación mejor que la que se observa cuando se compara la hidrofobicidad y las propiedades de superficie, ya que la hidrofobicidad es sólo la fuerza que dirige la migración de la proteína a la interfase, requiriéndose posteriormente una reorientación de la molécula. En la **Tabla 6** se resumen estas últimas relaciones entre propiedades de superficie y estructurales.

Tabla 6: Relación entre propiedades de superficie y funcionales.

Propiedad funcional		Factor estructural
Propiedades emulsionantes	Actividad	Hidrofobicidad superficial
	Estabilidad	Estabilidad proteica
Propiedades espumantes	Poder	Fuerzas de repulsión electrostáticas
	Estabilidad	Estabilidad proteica
		Interacciones proteína-proteína.

(Kato, 1991).

A partir del análisis efectuado de las relación existente entre características estructurales y funcionales, determinadas hasta el momento podemos concluir que aún falta mucho por hacer, siendo muy difícil establecer relaciones que tengan en cuenta todos los factores que determinan la funcionalidad, ya que no sólo es difícil cuantizar con parámetros las características estructurales de las moléculas de proteína, sino que también hay que sumarle las modificaciones que son producidas por el proceso y por la interacción con otros componentes, además de que los requerimientos estructurales son diferentes en las distintas etapas del proceso. Por ejemplo en la formación de una emulsión primero se produce una difusión hacia la interfase, seguida de una penetración y reordenamiento de la estructura, las proteínas más flexibles como las caseínas (ordenamiento al azar) se adsorben rápidamente a la interfase, en cambio la lisozima y la seroalbúmina bovina que son más estructuradas lo hacen más lentamente pero forman films más estructurados y por lo tanto más estables (Kinsella y Phillips, 1989; Damodaran, 1989).

7. Propiedades funcionales de las proteínas de soja.

Las propiedades funcionales de mayor interés para la utilización de las proteínas de soja en la elaboración de alimentos formulados son la capacidad de gelación, emulsificación y espumado. La solubilidad es un prerequisite para que la proteína pueda tener estas propiedades. La variación de la solubilidad de las proteínas de soja, tanto nativas como desnaturalizadas, con las modificaciones de la fuerza iónica no puede ser explicada con la teoría de Melander y Horvath (1977 a y b). La misma establece que la solubilidad de proteínas a bajas fuerzas iónicas debe incrementarse debido a una contribución electrostática a la energía libre, mientras que a altas concentraciones salinas la energía libre de salting out predomina produciendo una disminución de la misma. En las proteínas de soja ocurre el fenómeno opuesto ya que la solubilidad de la proteína decrece hasta un valor mínimo con la modificación en la concentración salina y luego se incrementa hasta un valor constante (Kumosinski, 1990). La forma de las curvas de solubilidad, tanto para proteínas de soja nativas como desnaturalizadas, cuando se adiciona NaCl, NH₄Cl, NH₄Br, NH₄NO₃ o NaI es la misma. El valor de solubilidad límite a altas concentraciones de sal sigue las series liotrópicas usuales o series de Hoffmeister. El comportamiento a bajas concentraciones

salinas puede ser adjudicado a un incremento con la adición de sal del área hidrofóbica superficial que conduce a una mayor interacción de la proteína consigo misma. Además la unión de iones a la proteína puede producir una modificación de la carga neta a cero, lo que induce el salting-out. Un incremento posterior en la concentración salina, produce un aumento en la unión de iones a la proteína, lo que resulta en un incremento de la carga y en salting-in. La unión de iones a la proteína es dependiente de su estructura secundaria y terciaria (Kumosinski, 1990).

La β -conglucina sufre una interconversión $7S \rightleftharpoons 9S$ con el cambio de la fuerza iónica. Posee una forma 7S (trimérica) a fuerzas iónicas superiores a 0.5M y una forma 9-10S (hexámerica) a fuerzas iónicas inferiores a 0.2M. A fuerzas iónicas entre 0.2-0.5M existe un equilibrio entre ambas formas. Este equilibrio se mantiene también a pH entre 4.8-11. A fuerzas iónicas muy bajas ($\mu < 0.01$) y pH ácido la subunidad α se disocia obteniéndose formas 2S y 5S (Thanh y Shibasaki, 1979). La reducción de la fuerza iónica tiende a producir la disociación de las subunidades α y α' de los trímeros; en cambio la subunidad β no se disocia ya que es menos polar pues carece del extremo amino terminal que poseen las subunidades α y α' . Dependiendo de la clase de β -conglucina B_0 (β_3); B_1 ($\alpha'\beta_2$); B_2 ($\alpha\beta_2$); B_3 ($\alpha'\alpha\beta$); B_4 ($\alpha\alpha\beta$); B_5 ($\alpha'\alpha_2$) o B_6 (α_3) será la sensibilidad a los cambios de fuerza iónica, ya que las formas con mayor contenido de subunidad β son menos sensibles (Thanh y Shibasaki, 1978; Yamauchi y col 1981; Sykes y Gayler 1981; Iwabuchi y col 1991 a y b).

La glicina presenta una forma hexamérica 11S ($(AB)_6$) a fuerzas iónicas superiores a 0.5M, transformándose en una forma dodecamérica a fuerzas iónicas inferiores a 0.1M. La exposición a fuerzas iónicas muy bajas ($\mu = 0.001$), pHs extremos o tratamientos con detergentes produce la disociación en una forma 7S ($(AB)_3$) y formas 3S (AB); mientras que tratamientos reductores producen una forma 2S (polipéptidos A y B libres) (Wolf y Briggs, 1956 y Wolf, 1978).

Por lo expuesto, tanto en el caso de la glicina como en el de la β -conglucina el mínimo de solubilidad que se observa puede deberse los dímeros de las formas 11S y 7S, respectivamente.

A pesar de que la solubilidad se toma frecuentemente como un indicador de desnaturalización, la ausencia de cambios en la solubilidad no debe interpretarse como carencia de cambios conformacionales (Kilara y Sharkasi, 1986). Los cambios

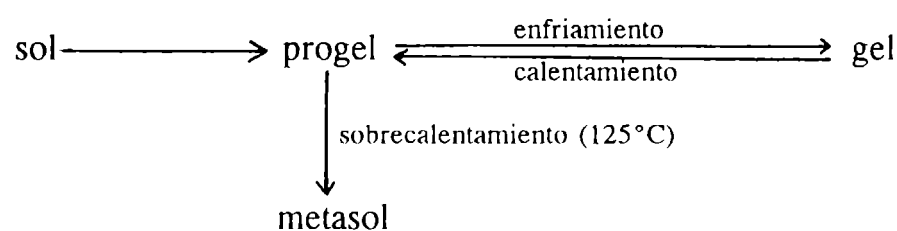
conformacionales de las proteínas bajo condiciones de desnaturalización por calor controladas son en general más pequeños que los que ocurren a pHs extremos (ácidos o alcalinos) o con cloruro de guanidinio, y el proceso de desnaturalización se considera parcial (Das y Kinsella, 1990).

La gelación inducida por calor es una propiedad muy importante en productos como el tofu y el yogurt; como así también en productos cárneos. Una de las características más salientes de los geles de proteínas de soja es su elevada capacidad de retención de agua, en comparación por ejemplo con las proteínas de leche. Esta propiedad resulta indeseable en quesos donde se desea que ocurra sinéresis pero resulta de utilidad en emulsiones cárnicas y yogurt (Barroquio y van de Voort, 1988). Los geles proteicos pueden ser divididos en los formados por agregación al azar y por asociación de moléculas o cadenas en forma más ordenada. Tanto la glicinina como la β -conglucina tienen la habilidad de formar estructuras ordenadas que consisten en cadenas de 10-15 nm de espesor. Los geles de la β -conglucina son más irregulares y entrecruzados que los de glicinina. Las cadenas que forman parte de los geles de β -conglucina también muestran un modo de agregación más complejo, disponiéndose en forma de espirales dobles, siendo las cadenas más compactas y menos ordenadas. Las cadenas de glicinina muestran una estructura cilíndrica hueca (Hermansson, 1986).

La desnaturalización es frecuentemente un requisito para que tenga lugar la formación del gel, pero también pueden formarse geles de proteínas ya desnaturalizadas, como así también geles a partir de proteínas nativas en ciertas condiciones. Un prerequisite absoluto para que ocurra la formación del gel es la interacción entre moléculas proteicas, cadenas o agregados de manera de formar una red tridimensional. Cuanto más ordenada sea esta estructura se obtendrán geles más transparentes (Hermansson, 1986). En la gelación reversible de proteínas inducida por calor, el papel primario del calentamiento a altas temperaturas es producir el desplegamiento y exponer los grupos funcionales. El estado estructural de la proteína en estas condiciones es denominado, usualmente, progel. Luego de un enfriamiento e incubación a bajas temperaturas ocurre la formación de interacciones intermoleculares entre los grupos funcionales expuestos. Es importante destacar que el estado estructural de la proteína en el estado progel (altas temperaturas) puede ser diferente del estado de la proteína a bajas temperaturas después de que se produce la gelación. En otras

palabras es posible que ocurra una recuperación parcial de la estructura de la proteína durante el régimen de enfriamiento. La extensión de este replegamiento o de formación de estructuras secundarias que experimenten las subunidades de la proteína depende de las condiciones de la solución como pH, fuerza iónica, clase de ión y también del régimen de enfriamiento. La extensión del replegamiento afecta el número de grupos funcionales disponibles para el entrecruzamiento molecular, por lo que determina las propiedades del gel. Por lo expuesto, el calentamiento de la proteína por encima de la temperatura de desnaturalización no es la única etapa crítica en el proceso de gelación térmica. La tendencia de la proteína a replegarse durante el régimen de enfriamiento juega un papel importante en la formación del gel. Variando la composición de la solución, por ejemplo la clase de ión presente, es posible modificar la concentración mínima para que ocurra formación del gel, como así también evitar la recuperación completa de la estructura proteica, que evitaría la gelación (Damodaran, 1988). La presencia de estructuras secundarias dentro del gel, afecta sus características reológicas, ya que por ejemplo la presencia de estructuras β permite el establecimiento de interacciones β - β a través de puentes de hidrógeno lo que le da más fuerza a la estructura del gel (Wang y Damodaran, 1991). Otro factor importante es el tamaño molecular de los agregados que forman parte del gel, en general cuanto más grandes son estos agregados más fuerte es el gel (Wang y Damodaran, 1990).

El mecanismo propuesto para la gelación de la glicinina es el siguiente:

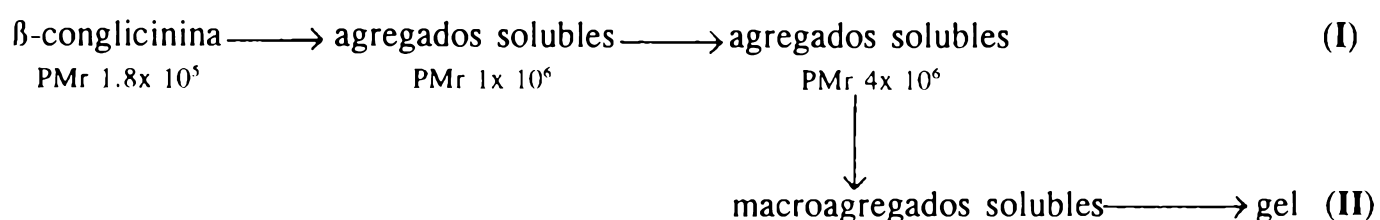


(Catsimpoolas y Meyer, 1970)

La transformación del estado nativo al estado progel es irreversible, mientras que la transformación de progel a gel es reversible. Van Kleef (1986) considera la gelación de proteínas de soja es irreversible, ya que con el enfriamiento no se recupera el estado nativo de las mismas; no obstante si se observa únicamente la conversión del estado líquido al sólido, se llega a la conclusión opuesta. El modelo propuesto por Nakamura y col (1984 b)

para el proceso de gelación inducida por calor de la globulina 11S incluye varias etapas. La primera de ellas es la formación de las cadenas 1 que son cadenas cortas formadas por seis o más moléculas, esta etapa es seguida por la formación de las cadenas 2 que se forman por la asociación de las cadenas 1 y finalmente ocurre la formación de las cadenas 3 que se producen por asociación de las cadenas 1 y 2 ya sea o no en forma ramificada. Las cadenas 1 están formadas por moléculas de glicinina no disociadas que se asocian axialmente a través de interacciones hidrofóbicas, formando cadenas, de un espesor similar a la molécula de glicinina nativa (10-12 nm), que no son ramificadas. La formación de uniones disulfuro a través de reacciones de intercambio produce cadenas ramificadas seguida de la formación de una red tridimensional y del gel. El ordenamiento de los polipéptidos A y B dentro del gel es similar al que presentan en la estructura nativa (Yamagishi y col 1987 y Yamauchi y col 1991). Las fuerzas involucradas en la gelación son diferentes si la misma se llevó a cabo a 80 o a 100°C. La disociación de la globulina 11S en los polipéptidos A y B produce la formación de geles más fuertes. A 80°C las uniones disulfuro no son necesarias para la formación de la estructura del gel, pero si las mismas se producen le confieren al gel elasticidad (Utsumi y Kinsella, 1985 a). La composición en subunidades de la glicinina afecta la velocidad de gelación, la dureza de los geles y su turbidez. La globulina 11S que contiene $A_5A_4B_3$ gelifica más rápidamente debido a que la ruptura de uniones hidrofóbicas de A_5 y A_4 ocurre fácilmente durante el tratamiento térmico. La presencia de A_3 juega un papel importante incrementando la dureza del gel, formándose una red más compacta con mayor grado de entrecruzamiento (Utsumi y Kinsella, 1985 a; Mori y col 1982 a y b; Nakamura y col 1984 a y 1985).

Nakamura y col (1986) proponen el siguiente mecanismo para la gelación inducida por calor de la β -conglucina:



Inicialmente se forman agregados solubles de un peso molecular relativo de aproximadamente un millón. Un subsiguiente calentamiento hace que los agregados solubles

se ensamblen en cadenas de peso molecular relativo de 4 millones, cuando la concentración proteica es baja, en caso contrario los agregados solubles se asocian al azar para formar macroagregados que producen la formación del gel (proceso II). En este proceso las reacciones de intercambio sulfhidrilo libre/disulfuro no se encuentran involucradas a diferencia de lo que ocurre en la gelación de glicinina (Nakamura y col 1984 b). Las distintas subunidades que forman parte de la globulina 7S contribuyen de manera uniforme a las características del gel (Utsumi y Kinsella, 1985 b).

Tabla 7: Fuerzas involucradas en la formación y mantenimiento de la estructura de geles de proteínas de soja.

Composición	Formación	Mantenimiento
11S	Interacciones hidrofóbicas Interacciones electrostáticas Uniones disulfuro	Puentes de hidrógeno Uniones disulfuro
7S	Interacciones hidrofóbicas Puentes de hidrógeno	Puentes de hidrógeno
Aislados	Interacciones hidrofóbicas Puentes de hidrógeno	Uniones disulfuro Puentes de hidrógeno

(Utsumi y Kinsella, 1985 a)

Los requerimientos para que ocurra la gelación de 7S y de 11S son diferentes; los geles de 11S son más fuertes que los de 7S (Saio y col 1974; Hashizume y col 1975). Los aislados de proteínas de soja y las mezclas de glicinina y β -conglycinina en igual proporción muestran mejores características de gelificación que sus fracciones constituyentes (Babajimopoulos y col 1983). En la gelación de aislados de proteínas de soja el polipéptido A₃ juega un papel importante en la formación de la estructura del gel, como lo hace en los geles de glicinina. El polipéptido A₄ también desempeña un papel importante (aunque no lo hace en el caso de geles compuestos únicamente por 11S) ya que interactúa con las subunidades de 7S. Las

subunidades de 7S al igual a lo que ocurre en geles formados únicamente por β -conglucina, aportan de manera uniforme a las características del gel (Utsumi y Kinsella, 1985 b).

Las fuerzas de interacción tanto en la formación como en el mantenimiento de la estructura del gel son diferentes. En la **Tabla 7** se resumen dichas interacciones para el caso de geles de 7S, 11S y aislados proteicos de soja.

Cabe aclarar que las temperaturas de desnaturalización de las proteínas de soja están en el rango de 75 a 90°C, lo que limita su utilización como aditivos en productos cárneos, ya que la temperatura de desnaturalización de la miosina es de 43-60°C, por lo que el tratamiento térmico al que son sometidos este tipo de productos (70°C) es insuficiente para que ocurra la gelación. Las proteínas de soja en estas condiciones no son capaces de formar un gel fuerte (Wright 1977; Shiga y Nakamura 1987).

Las propiedades emulsionantes de los aislados de soja son similares a las propiedades de los caseinatos; tienen la ventaja de que no se ablandan con el tratamiento térmico y que pueden gelificar lo que le otorga firmeza a la textura del producto final. Estas propiedades son importantes en productos como sopas, salsas, mayonesas y emulsiones cárnicas. Las proteínas pueden actuar favoreciendo tanto la formación de la emulsión como su estabilización. Para que una proteína sea capaz de actuar como emulsionante debe poseer un amplio rango de propiedades: alta hidrofobicidad superficial, con una limitada tendencia a la agregación proteica; suficiente hidrofiliidad para asegurar su solubilidad en un amplio rango de pH, alta capacidad de adsorción a la interfase y de reducción de la tensión interfacial; un buen balance de distribución de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos en la molécula; capacidad de formar un film cohesivo en la interfase aceite/agua; alto grado de flexibilidad conformacional, alta densidad de carga especialmente expuesta a la fase acuosa para crear una barrera de repulsión eléctrica y reducir el acercamiento de las gotas y la coalescencia (Halling, 1981; Kinsella, 1984 y Das y Kinsella, 1990). El alto grado de compactamiento que presentan las globulinas 7S y 11S hace que carezcan de muchas de estas características estructurales (Kinsella, 1979); por lo que se han propuesto distintos métodos ya sea físicos, químicos o enzimáticos para modificar estas propiedades.

El calor es el método físico más ampliamente utilizado. Ya que la interacción de la proteína en la interfase agua/aceite es fundamentalmente de naturaleza hidrofóbica, la exposición de grupos hidrofóbicos por tratamiento térmico, puede tener un efecto profundo

en las propiedades emulsionantes de las proteínas (Kato y Nakai, 1980; Kato y col 1981, 1983, 1986 a y b; Townsend y Nakai 1983; Voutsinas y col 1983 a y b; Matsudomi y col 1985 y Shimizu y col 1986). Matsudomi y col (1985) estudian el efecto de la desnaturalización de la globulina 11S en sus propiedades emulsionantes. Tanto la hidrofobicidad superficial como la estabilidad emulsionante se incrementa al incrementar la temperatura, lográndose un máximo a aproximadamente 80°C, el que es dependiente de las condiciones de fuerza iónica. Una reducción en la fuerza iónica produce un aumento en la estabilidad emulsionante.

El efecto de tratamientos térmicos sobre el estado de asociación-disociación de las globulinas 7S, 11S y aislados de proteínas de soja, ha sido muy estudiado, no así su relación con propiedades emulsionantes y espumantes. Por lo que vamos a hacer una descripción de las modificaciones estructurales que sufren estas proteínas con el tratamiento térmico.

Cuando la glicinina es sometida a tratamientos térmicos a pH 7.6 μ 0.5M se muestra estable hasta temperaturas de 70°C. A temperaturas de 70-90°C se produce la disociación de los polipéptidos ácidos y básicos seguida de insolubilización de los básicos. Si el tratamiento térmico se realiza a fuerzas iónicas menores a 0.5M, la disociación empieza a 70°C y se completa a 80°C (Catsimpoolas y Ekenstain 1969; Catsimpoolas 1970 y Hashizume y col 1975). Al realizar este tipo de tratamientos se observa que el sobrenadante está constituido mayoritariamente por monómeros y dímeros del polipéptido A y en menor proporción por trímeros y tetrameros del mismo polipéptido. El precipitado está formado por monómeros del polipéptido B y oligómeros y polímeros de los polipéptidos A y B. La presencia de reductores aumenta la velocidad de aparición del precipitado, aumentando la cantidad de monómeros del polipéptido B en el precipitado, mientras que la presencia de bloqueadores de reacciones de intercambio SH/SS impide la formación de precipitado, ya que la molécula en estas condiciones es incapaz de abrir su estructura y exponer sus restos hidrofóbicos (Yamagishi y col 1980; 1981 a y b; 1982 a y 1983 a). El modelo propuesto para la desnaturalización inducida por calor de la glicinina consta de varias etapas, la primera es la separación de los pares AB del hexámero, con la consiguiente exposición de regiones hidrofóbicas que estaban comprometidas en la unión de los mismos. En la segunda etapa se forman agregados de 15-20 moléculas por la asociación a través de las regiones hidrofóbicas. Este acercamiento es fundamentalmente a través de los polipéptidos básicos, ya que el

tratamiento se realiza a pH 7.6, que es próximo al punto isoelectrico del polipéptido B, por lo que las repulsiones electrostáticas entre dichos polipéptidos es baja. Luego se inician las reacciones de intercambio SH/SS que son promovidas por los grupos SH libres de los polipéptidos ácidos y básicos. Dichas reacciones producen la formación de oligómeros y polímeros de los polipéptidos básicos. Si la concentración de proteína no es suficiente para que ocurra la gelificación, los polipéptidos ácidos se liberan formando agregados solubles, mientras que los básicos como consecuencia de dicha liberación precipitan (Yamagishi y col 1982 a; Yamauchi y col 1991). Los espectros de dicroísmo circular de la globulina 11S muestran que la misma experimenta una recuperación parcial de la estructura durante el enfriamiento (Damodaran, 1988).

Cuando se realizan tratamientos térmicos de la glicinina en presencia de β -conglucina, se observa formación de macrocomplejos del polipéptido B que interactúan con la subunidad β -7S, a través de uniones no covalentes (German y col 1982, Damodaran y Kinsella, 1982, Utsumi y col 1984). Dicha interacción impide la insolubilización del polipéptido B. Se producen también otras interacciones entre las subunidades α y α' y el polipéptido A, las mismas son a través de uniones disulfuro (Yamagishi y col 1982 a, 1983 b y Yamauchi y col 1991).

El comportamiento de asociación-disociación inducido por calor de la β -conglucina también es muy sensible a modificaciones de la fuerza iónica. Tratamientos térmicos a 87°C a baja fuerza iónica y pH 7.6 producen un desplegamiento de la estructura que es aproximadamente un 80% del observado al tratar la β -conglucina con cloruro de guanidinio. El enfriamiento rápido produce un replegamiento recuperándose la estructura interna de los monómeros, pero la estructura cuaternaria no se recupera. Por lo tanto a bajas fuerzas iónicas la disociación de las subunidades es irreversible pero el desplegamiento de las subunidades disociadas es reversible (Iwabuchi y col 1991 a). Si el tratamiento es a temperaturas inferiores a 60°C, se retiene la estructura cuaternaria, en cambio si la temperatura es superior a 70°C la disociación es completa (Iwabuchi y col 1991 a y b). Si se adicionan sales llevando la fuerza iónica del medio a valores superiores a 0.1M se produce asociación de las subunidades, fundamentalmente α y α' , en formas 7S o 9S lo que indica que las subunidades recuperan en forma apreciable su estructura terciaria original (Iwabuchi y col 1982, Iwabuchi y col 1991 a). A pH mayor a 7.5 o a bajas fuerzas iónicas no ocurre agregación como

consecuencia del tratamiento térmico, ya que los grupos hidrofóbicos expuestos no son capaces de producir agregación de las subunidades disociadas pues priman las fuerzas de repulsión electrostáticas. Estas fuerzas son consecuencia de la alta polaridad que posee el extremo amino terminal de las subunidades α y α' (Iwabuchi y col 1991 a y b).

El efecto de tratamientos sobre las estructuras de las globulinas 7S y 11S es muy dependiente de las condiciones de tiempo/temperatura empleadas, pH, fuerza iónica, clase de ión, junto con las condiciones de enfriamiento utilizadas. Dependiendo de las condiciones puede ser que ocurra una recuperación de las estructuras nativas, disociación de las subunidades sin pérdida considerable de sus estructuras terciarias, interacción entre las subunidades formándose distintas clases de complejos, pérdida completa de estructura, etc. Todas estas modificaciones inciden directamente en las propiedades funcionales, pero las mismas se han estudiado de manera muy escasa.

Otro método físico que ha sido utilizado para modificar las propiedades funcionales de proteínas de soja es su sonicación en presencia de lecitinas que da origen a complejos proteína-lecitina (Ohtsuru y col 1976 y 1979, Utsumi y Kito 1991). La glicinina, la β -conglucina y los aislados de proteínas de soja complejados con lecitina muestran un aumento en su actividad emulsionante, el cual se incrementa notoriamente si el tratamiento se realiza con lecitina y etanol (Hirotzuza y col 1984).

Para mejorar las propiedades funcionales también se están utilizando métodos químicos: acilación, esterificación, fosforilación, deamidación, glicosilación, reducción de uniones disulfuro, etc. La acilación de proteínas, que consiste en la unión covalente de un grupo aniónico carboxilato (por ejemplo succinilación) a los grupos amino de la molécula proteica, actúa aumentando su carga negativa por lo que se favorecen las repulsiones electrostáticas lo que puede producir un incremento en la flexibilidad molecular y de la hidrofobicidad superficial y disminuir la tendencia a la asociación. Estas modificaciones, por ejemplo pueden favorecer la formación y estabilización de emulsiones (Das y Kinsella, 1990). Se ha determinado que la succinilación de proteínas de soja incrementa la solubilidad y propiedades emulsionantes a pH cercanos al isoelectrico (Franzen y Kinsella, 1976). La esterificación consiste en unir un alcohol al grupo carboxilo de la proteína, lo que aumenta la carga neta positiva, la hidrofobicidad superficial y flexibilidad molecular, por lo que incidirá también en la funcionalidad. La fosforilación de proteínas de soja produce un aumento del índice de

actividad emulsionante que es menor que el producido por succinilación, sin embargo las proteínas fosforiladas le otorgan a las emulsiones una mayor estabilidad ya que los grupos fosfatos aumentan la capacidad de hidratación del film, también incrementan las repulsiones electrostáticas entre las gotas de aceite (Das y Kinsella, 1990). La deamidación de proteínas también modifica la carga proteica, lo que produce un aumento en la solubilidad, actividad y estabilidad emulsionante (Das y Kinsella, 1990). La unión covalente de derivados de ácidos grasos (ácido láurico, mirístico, palmítico y oleico) a la proteína (proceso denominado lipofilización) aumenta la naturaleza anfifílica de la proteína lo que mejora propiedades de superficie, por ejemplo la palmitoil glicinina presenta mejores propiedades espumantes que la glicinina sin modificar (Haque y col 1982, Haque y Kito, 1982, Utsumi y Kito 1991). La glicosilación que consiste en unir azúcares neutros a la proteína, mejora las interacciones proteína solvente al aumentar la capacidad de formación de puentes de hidrógeno, lo que incrementa el espesor del film interfacial lo que mejora por ejemplo las propiedades espumantes. La unión de polisacáridos a la proteína mejora propiedades como solubilidad, termoestabilidad de la emulsión, previene la coagulación por desnaturalización térmica y mejora las propiedades emulsionantes; por ejemplo los complejos proteína de soja-dextran tienen un elevado índice de actividad emulsionante (Kato y col 1988). La reducción de uniones disulfuro puede producir pérdida de la estructura terciaria, aumentando la flexibilidad molecular, lo que puede mejorar por ejemplo la capacidad de desenrollamiento en la interfase. Una reducción parcial de la glicinina con ditiotreitól produce un incremento en la hidrofobicidad superficial y una mejora en sus propiedades espumantes, ya que produce un aumento en la viscoelasticidad del film (Kim y Kinsella 1986 y 1987). La reducción de la glicinina con Na_2SO_3 produce un incremento en la carga negativa y mejora sus propiedades espumantes (Kella y col 1986).

Otros métodos que se utilizan para mejorar la funcionalidad son las modificaciones enzimáticas. Por ejemplo la hidrólisis parcial incrementa el número de grupos cargados, debido a los grupos amino y carboxilos extras generados por la hidrólisis, también produce una disminución del peso molecular, incremento en la hidrofiliidad y cambios en la conformación molecular. Estos cambios tienen una influencia importante en la solubilidad y propiedades emulsionantes. Por ejemplo la digestión trípica de proteínas de soja mejora tanto la capacidad emulsionante como la estabilidad, dicha mejora es dependiente del grado de

hidrólisis (Ochiai y col 1982). La unión enzimática de n-alquil esteres a la molécula de proteína aumenta la lipofilicidad y mejora la actividad emulsionante; este método ha sido utilizado con buenos resultados en aislados de proteínas de soja (Das y Kinsella, 1990). La fosforilación enzimática también se ha utilizado para mejorar la capacidad espumante y estabilidad emulsionante de aislados de proteínas de soja (Campbell y col 1992). La glicinina tiene la habilidad de autoacilarse lo que mejora sus propiedades emulsionantes (Nishimura y col 1989).

Las modificaciones químicas o enzimáticas que alteran la carga de la proteína, pueden mejorar la solubilidad de las proteínas de soja en el rango de pH 3-6, que es de interés para que estas proteínas puedan ser utilizadas como agentes emulsionantes en condimentos para ensaladas, mayonesas, blanqueadores de café, etc.

Las proporciones relativas de las globulinas 7S y 11S varían con el grado de madurez de la semilla. Aquellos aislados que poseen un mayor contenido de la globulina 7S son mejores agentes emulsionantes que los más ricos en 11S. El almacenamiento de la semilla aumenta la proporción de 7S por lo que mejora las propiedades emulsionantes del aislado, pero disminuye sus propiedades de gelación ya que el gel formado resulta mas blando, por el menor contenido de 11S que es la fracción que le confiere fuerza al gel (Yao y col 1983; 1988 y 1990 y Tanteeratarm y col 1989).

OBJETIVOS

Las propiedades funcionales de proteínas de soja han sido estudiadas fundamentalmente utilizando las fracciones 7S y 11S puras, poniéndose énfasis en las condiciones de gelación. Los estudios realizados con aislados proteicos de soja son escasos y se han llevado a cabo básicamente con aislados de origen comercial donde las condiciones de procesamiento se desconocen por lo que la información que puede obtenerse de los mismos es reducida. En el curso del presente trabajo se estudiarán, en primer lugar, los componentes proteicos que forman parte de un aislado obtenido a nivel de laboratorio. En segundo lugar se analizarán las modificaciones estructurales que sufren estos componentes al ser sometidos a tratamientos reductores y térmicos en distintas condiciones. Cabe señalar que hasta el momento sólo ha sido estudiado el efecto de tratamientos reductores sobre la funcionalidad de la glicinina pura. El efecto sobre la β -conglucina y los aislados no ha sido considerado. Asimismo los estudios de asociación-disociación inducidos por calor de la glicinina, β -conglucina y aislados proteicos se han realizado a pHs próximos a 7.6 y en condiciones controladas de fuerza iónica. Dichas condiciones no son representativas de las imperantes durante la elaboración de aislados. Por consiguiente, se estudiarán las reacciones de asociación-disociación que sufren los componentes del aislado cuando son sometidos a tratamientos térmicos en distintas condiciones durante el proceso de obtención. Finalmente se analizará el efecto de algunos de estos tratamientos reductores y térmicos sobre las características estructurales y funcionales de los aislados, con el fin de establecer relaciones entre tratamientos, modificaciones estructurales y funcionales.

MATERIALES Y METODOS

1. Obtención de aislados.

Los aislados utilizados se obtuvieron a partir de harina de soja desgrasada (SANBRA S.A., Brasil) la cual se disolvió en agua a pH 8.0, alcalinizada con NaOH 2N (relación harina:agua- 1:10 p/v) durante dos horas a temperatura ambiente ajustándose el pH periódicamente. La suspensión obtenida se filtró a través de una gasa y el filtrado se centrifugó a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se llevó a pH 4.5 con HCl 2N. El precipitado se separó por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a 4°C y se resuspendió en agua ajustándose el pH. En este paso se hicieron distintos tratamientos:

1.1. Aislados utilizados en la caracterización estructural.

1.1.1. La neutralización se llevó a cabo a distintos pHs: 7; 8; 9 y 10, a dos concentraciones de proteína 1 y 10% (p/v), tratándose a temperatura ambiente o a 100°C durante 90 minutos.

1.1.2. Neutralización a pH 8 seguida de diálisis.

1.1.3. Tratamiento con 0.1 % p/v Na₂SO₃ seguido de eliminación del mismo por sucesivas precipitaciones isoelectricas hasta reacción negativa de sulfito en el sobrenadante con el reactivo de Ellman (método de Beveridge y col 1974).

Los aislados obtenidos de acuerdo a los procedimientos descriptos en los puntos 1.1.1 a 1.1.3. se liofilizaron.

1.2. Aislados utilizados en los estudios de reducción.

Se neutralizaron a pH 8 y se liofilizaron.

1.3. Aislados utilizados en los estudios de agregación.

Se suspendieron en agua ajustándose el pH a 7 . Los aislados así obtenidos se fraccionaron y conservaron a -20°C. La concentración de proteínas de los mismos se

determinó por el método de Biuret (Gornall y col 1949).

1.4. Aislados utilizados en las medidas de propiedades fisicoquímicas y funcionales.

A partir del proceso base descrito anteriormente se llevaron a cabo distintas modificaciones:

1.4.1. Tratamiento 1: neutralización a pH 7 o pH 9. La concentración de proteína a la que se realizaron estos tratamientos fue 10% p/v. Cada uno de estos dos aislados fue separado en tres alícuotas. La primera de ellas no se trató térmicamente. La segunda y la tercera se colocaron en un baño a 98°C retirándose a los 5 y 30 minutos respectivamente, enfriándose inmediatamente en un baño de hielo. Los tratamientos de 5 minutos no fueron lo suficientemente largos como para que la solución de proteína alcanzara la temperatura de 98°C. Las muestras se congelaron y liofilizaron. De esta manera se obtuvieron los aislados 1-6. Estos aislados no fueron dializados.

1.4.2. Tratamiento 2: se prepararon tres clases de aislados. Con el primero se siguió el proceso descrito anteriormente neutralizándose a pH 7. Para los otros en vez de llevar a cabo la precipitación isoeléctrica a pH 4.5, se realizó a pH 6.4 durante 18 horas a 4°C obteniéndose un aislado más rico en la globulina 11S. El sobrenadante de dicha precipitación se llevó a pH 4.8 y se obtuvo un aislado más rico en la fracción 7S. Estos aislados se neutralizaron a pH 7 y se sometieron a distintos tratamientos. Se dividieron en tres alícuotas, la primera se dejó como control, la segunda se trató con Na₂SO₃ 0.05% p/v y la tercera con Na₂SO₃ 0.05% p/v urea 6M, durante 3 horas a temperatura ambiente en un baño con agitación a 120 oscilaciones por minuto. La concentración de proteína a la que se realizó el tratamiento fue 4% p/v. Los nueve aislados obtenidos se dializaron (cut-off 12400) durante 48 horas a 4°C. Se neutralizaron a pH 7 y se liofilizaron (aislados 7-15).

1.4.3. Tratamiento 3: el aislado se neutralizó a pH 7 y se dividió en dos partes. Una se dejó como control y a la otra se le agregó Na₂SO₃ 2% p/v. La concentración de proteína a la que se realizó el tratamiento fue 4% p/v. Se dividieron a su vez en tres alícuotas. Una no se trató. Las otras dos se trataron térmicamente, una de ellas hasta que alcanzó la

temperatura de 80°C y la otra hasta que llegó a 92°C. Estos tratamientos se realizaron en un baño con agitación, a 120 oscilaciones por minuto. Una vez alcanzadas estas temperaturas se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Los tiempos que tardaron en llegar a estas temperaturas fueron de 6 y 12 minutos respectivamente. Los aislados se dializaron contra agua destilada a 4°C durante 48 horas y se liofilizaron (aislados 16-20).

2. Obtención de las fracciones 7S y 11S crudas.

Se utilizó el procedimiento descrito por Thanh y Shibasaki (1976). La harina desgrasada se extrajo con un buffer 0.03M Tris-HCl, 0.01M β -mercaptoetanol pH 8, durante una hora a 20°C (relación harina: buffer utilizada fue 1:20). El extracto se separó por centrifugación a 10000 x g durante 20 minutos a 20°C. La globulina 11S se precipitó ajustando el pH a 6.4 por adición de 2N HCl, separándose, posteriormente por centrifugación a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante de la precipitación de 11S se ajustó a pH 4.8, precipitándose la globulina 7S. La fracción 11S se lavó con un buffer 0.03M Tris-HCl pH 6.4, posteriormente se disolvió en buffer 0.03M Tris-HCl 0.01M β -mercaptoetanol pH 8 dejándose toda la noche a 4°C, de esta manera se precipitó una forma polimerizada. Se centrifugó y el sobrenadante se dializó contra agua, a 4°C durante 24 horas. La fracción 7S se redisolvió en 0.03M Tris-HCl 0.01M β -mercaptoetanol pH 8 durante toda la noche. Ambas fracciones se liofilizaron.

3. Cinética de la reacción de sulfitólisis

En un erlenmeyer de 125ml se prepararon 50ml de solución de aislado (10mg/ml) en buffer fosfato 0.1M pH 7 conteniendo 0.1M Na_2SO_3 . La solución se incubó 15 minutos a 42°C en un baño con agitación termostatizado. Se le adicionó 0.1M CuSO_4 amoniacal (pH 10) de manera que la concentración en la mezcla de reacción fuera 1.33mM o 4.0mM y la sulfitólisis se inició por agitación a 120 oscilaciones por minuto. En estas condiciones se asume que la solución está saturada en O_2 durante la reacción (Kella y Kinsella, 1985 y Gonzalez y Damodaran, 1990).

El progreso de la reacción se monitorea como se explica a continuación. A intervalos regulares de tiempo, la reacción se detuvo por adición de 0.1ml de 0.2M EDTA (pH 7) a

0.4ml de la mezcla de reacción. La concentración de disulfuros remanentes en estas muestras se determinó por el método de Thannhauser y col (1984), como se describe posteriormente. El contenido de proteínas se determinó en una alícuota similar, sin adición de EDTA, por el método de Biuret (Gornall y col 1949). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

En los casos en los que no se adicionó cobre, el dosaje de sulfhidrilos totales se hizo directamente a cada tiempo de reacción.

Cuando no se adicionó cobre ni se agitó, los tiempos de reacción se tomaron a partir de la adición de Na_2SO_3 .

Con el objeto de determinar el efecto de la concentración de Na_2SO_3 en la reacción de reducción se adicionaron distintas cantidades de sal a soluciones de un aislado proteico de soja (8 mg/ml en buffer fosfato 0.1M) a 42°C y a temperatura ambiente. A distintos tiempos, luego del agregado el Na_2SO_3 , se tomaron muestras y se dosaron sulfhidrilos totales.

4. Cinética de agregación.

El aislado proteico se descongeló y se fraccionó en tubos eppendorf de 1.5ml, colocando 1ml de solución por tubo. El calentamiento se realizó en un baño termostatzado a 90°C o a 100°C. La velocidad de calentamiento se registró utilizando una termocupla Cobre-Constantan colocada dentro de la solución proteica. Como referencia se utilizó un baño de agua-hielo. Se tomaron muestras en tiempos cortos de 1-15 minutos y posteriormente se realizaron tratamientos prolongados de 20-90 minutos. A los distintos tiempos se retiraron los tubos eppendorf y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Luego de una hora en estas condiciones, se tomó una alícuota de cada muestra llevándola a una concentración de 10 mg/ml con distintos buffers: 0.1M fosfato, 6M urea pH 7; 0.1M fosfato, 1 % p/v SDS pH 7 y 0.1M fosfato 6M urea, 1 % p/v SDS, 5 % v/v β -mercaptoetanol pH 7. Se dejó extraer una hora a temperatura ambiente realizándose agitaciones periódicas en vortex y posteriormente se diluyó con el buffer de muestra para la electroforesis. Las muestras se congelaron a -20°C hasta el momento de la corrida electroforética.

Para estudiar el efecto de la concentración de aislado se hicieron diluciones del mismo en agua llevando la concentración proteica a 80; 60; 40; 20 y 10% p/v del valor inicial. Posteriormente se realizó el tratamiento térmico a 100°C durante 6 minutos. Las extracciones se realizaron únicamente con el buffer 0.1M fosfato 6M urea pH 7 llevando la concentración

de proteína a 10mg/ml.

También se evaluó el efecto del pH para lo cual el pH del aislado se reajustó llevándolo a pH 6 con HCl o a pH 8; 9 y 10 con NaOH; realizándose los tratamientos térmicos a 90°C y a 100°C en tiempos de 1-15 minutos. La concentración de proteína usada fue 14 mg/ml.

Para analizar el efecto de la temperatura se trató un aislado proteico (70 mg/ml) a 50; 60; 70; 80; 90 y 100°C durante 1; 5 y 30 minutos.

Por último se trató térmicamente a un aislado proteico (14 mg/ml) a pH 7 en presencia de 0.01 % p/v Na₂SO₃. Los tratamientos se efectuaron a 100°C (0; 1; 2; 3; 5; 10 y 15 minutos) y a 90°C (0; 5; 10; 15 y 30 minutos). La agregación se siguió por electroforesis y por dosaje de sulfhidrilos totales por el método de Thannhauser y col (1984). En este caso no se realizó extracción con buffer 0.1M fosfato 6M urea pH 7 sino que se diluyó directamente con el buffer de muestra para la electroforesis.

5. Caracterización estructural.

5.1. Electroforesis

5.1.1. Electroforesis disociantes (SDS-PAGE)

Se realizó utilizando un sistema buffer continuo y disociante:

Buffer de separación: 0.4 % p/v SDS, 1.50M Tris-HCl, 0.4 % v/v TEMED, pH 8.8.

Buffer de muestra: 1.0 % p/v SDS, 0.05 % p/v azul de bromofenol, 40 % v/v glicerol, 0.125M Tris-HCl pH 6.8; en algunos casos se le adicionó 5 % v/v de β-mercaptoetanol.

Buffer de corrida: 0.025M Tris-HCl, 0.192M Gly, 0.1 % p/v SDS, pH 8.3.

Solución madre de acrilamida: 30 % p/v acrilamida, 0.8 % p/v bisacrilamida.

El gel se preparó haciendo un gradiente de acrilamida 5-15 %. Con este fin se prepararon dos soluciones: la solución concentrada con un contenido de acrilamida 15 % p/v y la diluida con 5 % p/v de acrilamida, a ambas soluciones se les agregó la cantidad del buffer de separación de forma que quede diluido 4 veces y se completó el volumen con glicerol y agua para las soluciones concentradas y diluidas, respectivamente. Las soluciones se colocaron en los vasos comunicantes: la solución concentrada en el vaso conectado directamente a la

bomba peristáltica. Los volúmenes de ambas soluciones eran iguales para que el gradiente sea lineal y la suma de estos volúmenes era igual a la capacidad del reservóreo donde se arma el gel. La polimerización se inició por el agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 10% p/v, adicionándose una cantidad mayor a la solución más diluida. Las cantidades empleadas se ajustaron de forma que se tenga el tiempo suficiente para cargar las placas sin que ocurra polimerización y que esta no sea muy lenta. Los geles se sembraron y corrieron a 20 mA por placa de 0.75mm de espesor.

5.1.2. Electroforesis no disociantes.

5.1.2.1. Electroforesis alcalina (Alkaline-PAGE)

El gel se realizó a una concentración de acrilamida de 7.5% p/v en presencia de urea 7M y buffer 0.375M Tris-HCl pH 8.8. El buffer de corrida utilizado fue 0.025M Tris-HCl, 0.192M Gly pH 8.5 o 9.5. El buffer de muestra utilizado fue 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 10% v/v glicerol, 7M urea, 0.05% p/v azul de bromofenol. En algunos casos contenía 5% v/v de β -mercaptoetanol.

5.1.2.2. Electroforesis ácida (Acid-PAGE)

Se realizó a una concentración de acrilamida de 7.5% p/v en presencia de 7M urea y 10% v/v de ácido acético glacial. El sistema de gelificación utilizado fue 1% v/v de TEMED y 0.1% p/v de persulfato de amonio, dejándose gelificar durante toda la noche. El buffer de corrida utilizado fue 10% v/v de ácido acético y el de muestra 7M urea 0.1M HCl, 0.01% p/v verde de metilo (Kitamura y col 1976).

A ambas electroforesis no disociantes se les realizó una preelectroforesis de una hora a 15 mA por placa de 0.75 mm de espesor, a fin de eliminar el exceso de persulfato de amonio. La electroforesis se realizó a intensidad constante de 20mA por placa de 0.75 mm de espesor durante aproximadamente 3.5 horas.

En ningún caso se empleó un gel apilador ya que se observó que el mismo no mejoraba la separación. Las muestras utilizadas en las siembras contenían 10 mg de proteína por mililitro. Para los geles ácidos o alcalinos se utilizó 5 μl de esta solución y para las

electroforesis disociantes 8 μ l. El empleo de volúmenes pequeños de muestra y la mayor longitud del gel obtenida al no realizar un gel apilador pueden justificar la mejor resolución lograda cuando se utiliza un sistema buffer continuo en vez de un sistema buffer discontinuo.

5.1.3. Electroforesis bidimensionales.

Se realizaron electroforesis bidimensionales de muestras corridas en la primera dimensión en un gel SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15 %, efectuándose la segunda dimensión en un gel SDS-PAGE en presencia de β -mercaptoetanol.

También se hicieron electroforesis bidimensionales de muestras corridas en la primera dimensión en geles ácidos o alcalinos ya sea en presencia o en ausencia de β -mercaptoetanol. La segunda dimensión se realizó en un gel SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15 % en presencia de β -mercaptoetanol en los casos en que el mismo se había empleado en la primera dimensión.

Luego de corrida la primera dimensión, los geles se cortaron congelándose las distintas calles en glicerol 10 % v/v a -20°C . Antes de efectuar la segunda dimensión las calles se trataron con 10 volúmenes de buffer 62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 1 % p/v SDS, 20 % p/v sacarosa, con o sin agregado de 0.2M β -mercaptoetanol durante 30 minutos a 55°C , con dos cambios de solución (Utsumi y col 1984). Los geles preparados para la primera dimensión tenían un espesor de 0.75mm y los de la segunda dimensión de 1.5mm para poder sembrar sin dificultad la porción de gel de la primera dimensión.

Una vez colocada la calle sobre el gel de la segunda dimensión se le adicionó una solución 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 1 % p/v SDS y 0.01 % p/v azul de bromofenol y se corrió a corriente constante de 40 mA por placa.

Los geles se fijaron y colorearon con Coomassie R-250 (0.1 % p/v) en agua:metanol:ácido acético 5:5:2 durante 12 horas. Posteriormente se decoloraron con metanol 25 % v/v, ácido acético 10 % v/v.

Los densitogramas correspondientes a cada gel se llevaron a cabo en un espectrodensitómetro Shimadzu de doble longitud de onda TLC Scanning CS-910. Las longitudes de onda utilizadas fueron 570nm y 395nm para la muestra y la referencia, respectivamente.

5.2. Determinación de grupos sulfhidrilos libres y totales.

5.2.1. Determinación de grupos sulfhidrilos libres.

Se determinaron por el método de Beveridge y col (1974) disolviendo 50mg de aislado en 5ml de buffer 0.086M Tris, 0.09M Gly, 0.004M EDTA, 8M urea pH 8. A alícuotas de 1ml se le adicionó 40 μ l de reactivo de Ellman (4mg/ml en metanol). La absorbancia a 412 nm del NTB producido en la reacción se determinó a los 15 minutos ($\epsilon = 13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La concentración de proteínas se determinó por el método de Biuret (Gornall y col 1949) empleando, para la realización de la curva de calibración, albúmina bovina disuelta en urea 8M. Las determinaciones se realizaron por duplicado. El número de sulfhidrilos libres se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$SH_L = 73.53 \frac{(DO_1 - DO_2 - DO_3)}{C} \quad (3)$$

siendo:

SH_L = concentración de sulfhidrilos libres en la muestra (μ moles SH/g proteína)

DO_1 = absorbancia a 412 nm de la muestra con el reactivo de Ellman a los 15 minutos de agregado

DO_2 = absorbancia a 412 nm de la muestra sin el reactivo de Ellman

DO_3 = absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos

C = concentración de proteína en la muestra (mg/ml)

5.2.2. Determinación de grupos sulfhidrilos totales.

5.2.2.1. Síntesis del 2-nitro-5-tiosulfobenzoato (NTSB)

El NTSB fue sintetizado de acuerdo con el método de Thannhauser y col (1984), con pequeñas modificaciones. El DTNB (0.1g) fue disuelto en 10ml de 1M Na_2SO_3 . El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 7.5 y se adicionó 50 μ l de solución de 0.1M CuSO_4 amoniacal. La reacción se inició por agitación en un baño termostatzado a 38°C, a 120

oscilaciones por minuto, se detuvo cuando más del 99% del NTSB se había producido, determinándose por medida de la absorbancia a 412nm del NTB remanente. La solución madre se almacenó a -80°C.

La solución NTSB ensayo se preparó por dilución 1:100 de la solución madre en un solución de 0.2M Tris-Base fresca preparada con 0.1M Na₂SO₃, 10mM EDTA y 3M de tiocianato de guanidinio. El pH de esta solución se ajustó a 9.5 con HCl.

5.2.2.2. Determinación de grupos sulfhidrilos totales

La determinación de uniones disulfuro totales se realizó por el método de Thannhauser y col (1984) y Damodaran (1985), mezclando 70μl de la solución de aislado (≈ 10 mg/ml) con 1ml de NTSB pH 9.5 recién preparado. Se dejó desarrollar color durante 20 minutos en la oscuridad y se determinó la absorbancia a 412nm usando como referencia NTSB ensayo. Para transformar la absorbancia en concentración de sulfhidrilos, se utilizó el coeficiente molar de extinción 13600M⁻¹cm⁻¹. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

La concentración de proteína se determinó por el método de Biuret, utilizando albúmina bovina como standard (Gornall y col 1949).

$$SH_T = 73.53 \frac{(DO_1 - DO_2)}{V C} 1000 \quad (4)$$

siendo:

SH_T = concentración de sulfhidrilos totales en la muestra (μmoles SH/g proteína)

DO₁ = absorbancia a 412 nm de la muestra con el reactivo de Ellman a los 15 minutos de agregado.

DO₂ = absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos.

V = volumen de muestra (μl) agregado a 1 ml del reactivo de Thannhauser.

C = concentración de proteína en la muestra (mg/ml)

5.3. Calorimetría diferencial de barrido.

El grado y temperaturas de desnaturalización de los aislados de proteína de soja se

determinaron por calorimetría diferencial de barrido utilizando un calorímetro DSC Dupont 910 conectado a un registrador Hewlett Packard 7046B. Se colocaron de 15-18 μ l de una solución de proteína 10-20% p/v en una cápsula de aluminio prepesada, que se cerró herméticamente y se pesó nuevamente. Una cápsula doble vacía se utilizó como referencia. Las cápsulas se calentaron de 30 a 130°C en la celda del DSC, a una velocidad de 10°C por minuto. La cantidad de proteína se determinó por diferencia de pesada entre el peso de las cápsulas secadas en una estufa a 100°C y el peso de las cápsulas vacías. Para cada termograma se trazó una línea de base construida como una línea recta que une el comienzo y la finalización de la transición térmica. El área del termograma se midió con un analizador de imágenes Morphomat 30 Zeiss. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. La calibración se realizó utilizando como referencia indio. El coeficiente de calibración de la celda del DSC se determinó del termograma de una cantidad pesada de indio con el conocimiento de su entalpía de fusión (28.4 J/g). El eje de temperatura se calibró realizando calentamientos de indio a una velocidad de 10°C por minuto, calculando la resistencia térmica (R_0) y β_0 (corrección por la velocidad de calentamiento).

La entalpía de desnaturalización se determinó de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta H = \frac{A \cdot 60 \cdot \Delta q_s \cdot S_x}{m \cdot \beta} \quad (5)$$

siendo:

ΔH = entalpía de la transición (cal/g)

A = área de la endoterma (cm²)

60 = 60 seg/min

S_x = sensibilidad en el eje x (°C/cm)

β = velocidad de calentamiento (°C/min)

m = masa de muestra seca (mg)

$\Delta q_s = S_y \cdot E \cdot 4.18$ (mcal/seg cm)

siendo S_y la sensibilidad en el eje y y E el coeficiente de calibración de la celda.

La temperatura de desnaturalización se corrigió de acuerdo con la ecuación:

$$T_{\max} = T_P - R_0 \cdot h \cdot S_y - \beta_0 \quad (6)$$

siendo:

T_{max} = temperatura correspondiente al pico (mV)

T_p = temperatura observada del pico (mV)

R_0 h S_y = término correspondiente al retardo térmico

R_0 = resistencia térmica

h = altura de pico (cm)

S_y = sensibilidad en el eje y (mV/cm)

β_0 = corrección por la velocidad de calentamiento (mV)

5.4. Determinación de la Hidrofobicidad Superficial

Los aislados se disolvieron en buffer fosfato 0.1M pH 7 a una concentración de 4 mg/ml durante 30 minutos a 20°C, con agitaciones periódicas. Se centrifugaron a 10000 x g durante 30 minutos a 15°C. Se hicieron diluciones seriadas con el mismo buffer en concentraciones comprendidas entre 0.0025-4.0 mg/ml. Posteriormente se determinó la hidrofobicidad superficial por agregado de diferentes sondas. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry usando albúmina bovina como standard. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

5.4.1. Hidrofobicidad superficial con Acido 8-anilino- 1-naftalen sulfónico (ANS) (método de Hayakawa y Nakai 1985 b)

El método se estandarizó por ajuste de la intensidad de fluorescencia relativa, leída en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo 2000, a un 80 % de la escala cuando 15 μ l ANS 8 mM se adicionaron a 3ml de metanol absoluto. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 364nm y 484nm, respectivamente.

Se determinó la cantidad de sonda necesaria para producir la saturación de la muestra. Para ello a la muestra más concentrada se le adicionaron distintas cantidades de ANS hasta que no se produjeran cambios en la intensidad de fluorescencia. La cantidad de sonda necesaria para la saturación fue 25 μ l ANS 8mM para 3ml de muestra.

Se determinó la longitud de onda de máxima emisión de un aislado haciendo un barrido entre 395-600 nm. La longitud de onda determinada fue 475nm.

Se prepararon dos series de tubos de 3 ml de cada dilución. Uno fue utilizado como

blanco y al otro se le adicionó 25 μ l de ANS. Los conjugados proteína-ANS se excitaron a 364nm y se registró la emisión a 475 nm. Se realizó además un blanco adicionando 25 μ l de ANS a 3ml de buffer fosfato 0.1M pH 7.

La intensidad de fluorescencia neta a cada concentración de proteína se determinó restando a la intensidad de fluorescencia correspondiente a la muestra con ANS, la intensidad de fluorescencia de la muestra sin sonda. Como índice de la hidrofobicidad superficial se utilizó la pendiente inicial (H_0) de la curva de intensidad de fluorescencia versus concentración de proteína. La pendiente se determinó por análisis de regresión lineal.

5.4.2. Hidrofobicidad superficial con Acido cis-parinárico (CPA) (Método de Kato y Nakai, 1980).

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, realizándose la calibración del espectrofluorómetro por agregado de 15 μ l de una solución 3.6mM CPA y 3.6mM BHT en etanol absoluto a 3ml de decano, la lectura se llevó a un 56% de la escala. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 325nm y 420nm respectivamente.

Se hizo un barrido de longitudes de onda entre 390-600nm determinándose que la longitud de onda de máxima emisión para un aislado de proteína de soja era 425nm. Se determinó también la cantidad de sonda necesaria para producir la saturación de la muestra: 15 μ l CPA para 3ml de muestra.

5.4.3. Hidrofobicidad superficial con 1,6-Difenil-1,3,5 Hexatrieno (DPH) (Método de Hayakawa y Nakai, 1985 b).

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, realizándose la calibración del espectrofluorómetro por agregado de 5 μ l de una solución 1mM DPH en tetrahidrofurano a 3ml de decano, la lectura se llevó a un 96% de la escala. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 360nm y 430nm respectivamente.

Se hizo un barrido de longitudes de onda entre 390-600nm determinándose la longitud de onda de máxima emisión para un aislado de proteína de soja a 435nm. Se determinó también la cantidad de sonda necesaria para producir la saturación de la muestra: 5 μ l DPH 0.1mM DPH para 3ml de muestra.

5.5. Determinación de la Hidrofobicidad Total

Las muestras se disolvieron en una solución 1.0% p/v SDS buffer fosfato 0.1M pH 7, en una concentración de 4 mg/ml. Se realizó un tratamiento térmico a 100°C durante 10 minutos y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Posteriormente se hicieron diluciones con el mismo buffer y se determinó la hidrofobicidad de la manera descrita anteriormente utilizando como sonda ANS. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry usando albúmina bovina disuelta en el mismo buffer como estandar (Townsend y Nakai 1983). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

6. Medida de propiedades funcionales.

6.1. Solubilidad en agua

Los aislados se disolvieron durante una hora a temperatura ambiente a una concentración de 1% p/v. Periódicamente se realizaron agitaciones con vórtex. Luego se centrifugaron a 10000 x g durante 30 minutos a 15°C y se dosó proteína en el sobrenadante por el método de Biuret. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

6.2. Capacidad de retención de agua

Se determinó por diferencia de pesada entre la masa del precipitado que queda luego de la centrifugación y la cantidad de proteína pesada en la determinación de solubilidad, a la que se le restó, previamente, la cantidad de proteína disuelta. De esta manera se obtienen los gramos ó ml de agua retenidos por el precipitado. Dividiendo este valor por la masa inicial del aislado se obtiene la capacidad de retención de agua (WHC), cuyas unidades son ml H₂O/g aislado.

$$WHC = \frac{m_2 - (m_1 - m_3)}{m_1} \quad (7)$$

siendo:

WHC = capacidad de retención de agua (ml/g)

- m_1 = masa del aislado (g)
 m_2 = masa del precipitado (g)
 m_3 = masa de proteína disuelta (g)
 δ = densidad del agua (1 g/ml)

6.3. Viscosidad

Se prepararon soluciones al 10% p/v de los aislados en agua y se midió la viscosidad utilizando un viscosímetro Haake RV 2, sensor system NV. La velocidad de giro del rotor se incremento de 0 a 128 rpm en 2 minutos, se mantuvo a esta velocidad durante 1 minuto, llevándose finalmente de 128 a 0 rpm en 2 minutos. La determinación se realizó a 20°C. La viscosidad aparente se calculó a 128 rpm. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$\eta_{ap} = \frac{G S}{n} \quad (8)$$

siendo:

- η_{ap} = viscosidad aparente (mPa.seg)
 S = momento de giro generado por la sustancia ensayada (Skt)
 n = velocidad de giro del rotor (min^{-1})
 G = constante relacionada con la geometría del rotor (mPa.seg/Skt.min)

La velocidad y el esfuerzo de corte pueden calcularse de acuerdo con las ecuaciones:

$$D = M n \quad (9)$$

$$\tau = A S \quad (10)$$

siendo:

- D = velocidad de corte (seg^{-1}).
 τ = esfuerzo de corte (Pa).
 A = constante relacionada con la geometría del rotor (Pa/Skt).
 M = constante relacionada con la geometría del rotor (min/seg).

Los valores de A, M y G para el sistema de cilindros coaxiales utilizado son 1.78; 5.41 y 329, respectivamente.

6.4. Propiedades emulsionantes.

6.4.1. Medida de la actividad emulsionante.

Se realizó por el método de Pearce y Kinsella (1978). Se dispersaron 6 ml de solución de proteína (≈ 1.0 mg/ml) en buffer fosfato 0.1M pH 7 con 2ml de aceite de girasol (cuya composición en ácidos grasos era: 14:0, 0.06%; 16:0, 5.96%; 16:1, 0.11%; 18:0, 3.58%; 18:1, 28.65%; 18:2, 59.97%; 20:0, 0.21%; 18:3, 0.09%; 20:1, 0.26%; 22:0, 0.77%; 24:0, 0.32%) en un Omnimixer durante 30 segundos. La emulsión formada se diluyó inmediatamente con una solución estabilizadora compuesta por 0.1% p/v SDS 0.1M NaCl pH 7. Se realizaron dos diluciones seriadas 1/10 y 1/25 rápidamente, respetando los tiempos a los que se hace cada dilución para todas las muestras (15 segundos para la primera dilución y 25 segundos para la segunda, a partir del momento en que se interrumpe la homogeneización) y se leyó la densidad óptica a 500nm de la última dilución. Las diluciones se realizaron por cuatuplicado y de cada muestra se prepararon dos emulsiones.

El método de Pearce y Kinsella (1978) se basa en que la turbidez producida por una dispersión de partículas es proporcional al área interfacial:

$$\text{Area interfacial} = 2 T \quad (11)$$

siendo:

T = turbidez

$$T = \frac{2.303 A}{l} \quad (12)$$

siendo:

A = absorbancia a 500nm

l = camino óptico (cm)

Se define el Índice de Actividad Emulsionante (IAE) como:

$$IAE = \frac{2 T}{\phi C} \quad (13)$$

siendo:

ϕ = fracción volúmetrica de la fase dispersa

C = concentración de proteína por unidad de volumen de la fase acuosa

$$IAE = 2 \frac{2.303 A}{l \phi C} \quad (14)$$

En este caso:

$$\phi = 0.25$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$C = 1 \text{ mg/ml}$$

6.4.2. Determinación de la desestabilización por floculación-cremado.

Se realizó de acuerdo con el método descrito por Dagorn Scaviner y col (1987). Se preparó la emulsión de la manera descrita en la determinación de actividad emulsionante. Inmediatamente después de preparada se volcó en una probeta de 10 ml. Se observó la separación de dos fases: fase acuosa y fase crema. Se tomaron los volúmenes de fase acuosa a distintos tiempos. El tiempo cero corresponde al fin del trasvaso. El intervalo entre distintas lecturas depende de la velocidad del proceso de separación de las dos fases. Se determinó el volumen de fase acuosa en el equilibrio 24 horas después de preparada la emulsión. Las determinaciones se hicieron al menos por duplicado.

Si se grafica el volumen de fase acuosa separada en función del tiempo se obtiene una curva como la mostrada en la **Figura 5**. La misma se aproxima arbitrariamente a una cinética de primer orden de acuerdo con la ecuación:

$$LN \frac{V_e}{(V_e - V_t)} = k t \quad (15)$$

siendo:

V_e = volumen de fase acuosa en el equilibrio (24 horas)

V_t = volumen de fase acuosa al tiempo t (ml)

k = constante de velocidad de desestabilización (seg^{-1})

t = tiempo transcurrido desde que se finalizó el trasvaso (seg)

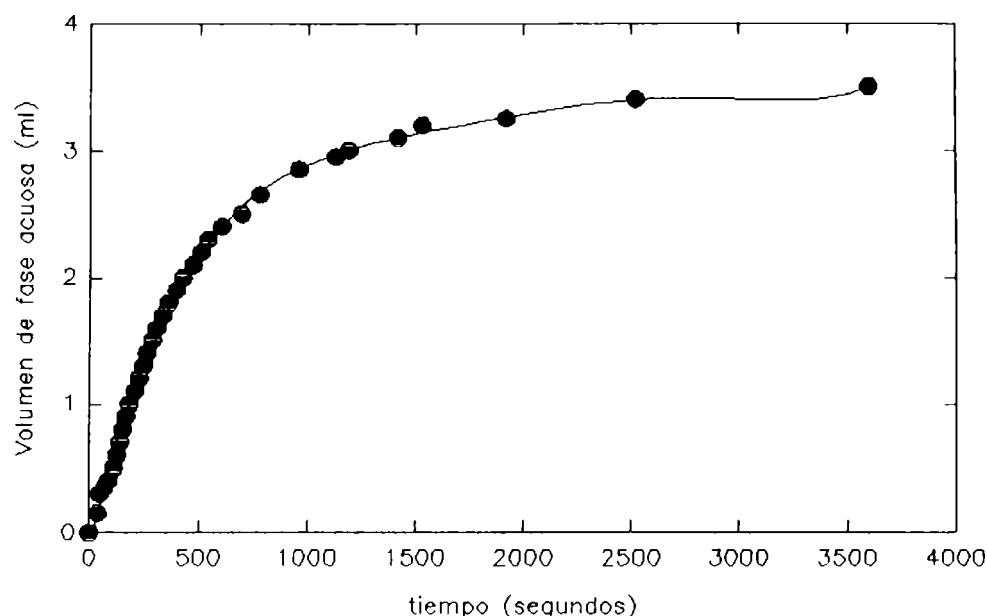


Figura 5: Volumen de fase acuosa separada en función del tiempo.

La curva que se obtiene al graficar $\text{LN } V_e/(V_e - V_t) = f(t)$ representa una sucesión de segmentos, que pertenecen a cinéticas de primer orden. Las pendientes de estos segmentos dan la constante de velocidad de las distintas etapas del proceso de floculación-cremado (**Figura 6**). Cada etapa del proceso se puede aproximar a una recta pero para facilitar el análisis de estas curvas se toman, en forma arbitraria, dos rectas: la primera evalúa la desestabilización durante los primeros 500 segundos y la segunda en el período comprendido entre 500-2500 segundos. Ambas pendientes se determinan por análisis de regresión lineal. Algunas muestras presentan un cambio de pendiente en estos períodos de tiempo por lo que los coeficientes de correlación resultan bajos, pero si para cada muestra se determinan las pendientes a distintos intervalos de tiempo se obtienen una serie de pares k y Δt que son más difíciles de interpretar.

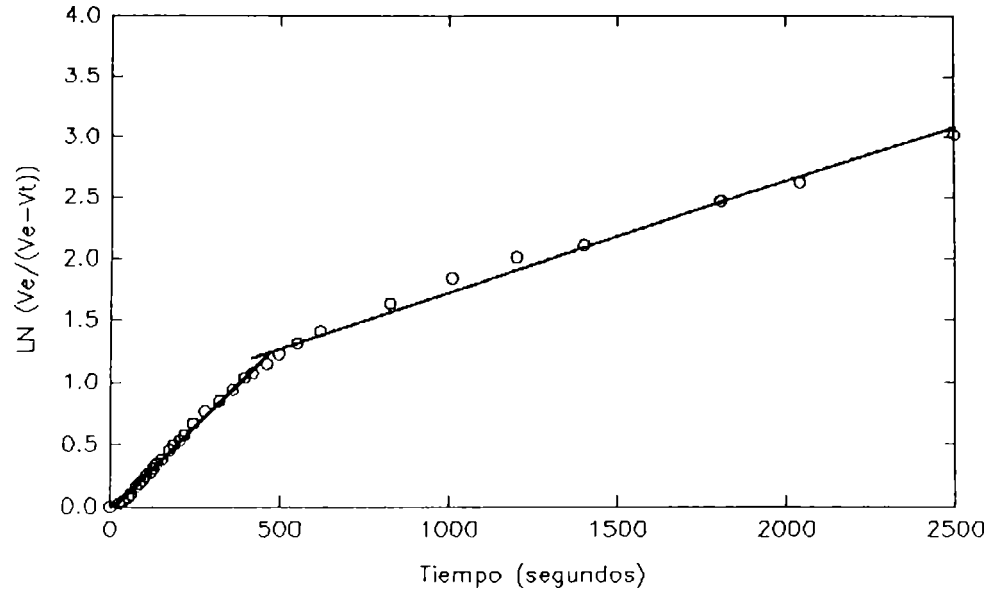


Figura 6: LN (Ve/(Ve-Vt)) en función del tiempo.

Los parámetros que se utilizaron para caracterizar la emulsión por este método son:

V_e = volumen de fase acuosa en el equilibrio (ml)

V_i = volumen intersticial de agua en la fase crema (ml)

ϕ = fracción volumétrica de aceite: volumen de aceite/volumen de emulsión.

k_1 = velocidad de floculación-cremado durante los primeros 500 segundos (seg^{-1}).

k_2 = velocidad de floculación-cremado entre 500-2500 segundos (seg^{-1}).

En este caso:

$$V_e = V_{24\text{hs}}$$

$$V_i = 6 - V_e$$

$$\phi = 2/(8 - V_e)$$

Cuando la emulsión es inestable k_1 y k_2 son grandes, ϕ tiende a 0.74 (valor teóricamente calculado para una dispersión de gotas hexagonales perfectamente empaquetadas donde el espacio intersticial es mínimo, Halling, 1981) ó a 1 si hay coalescencia (fases completamente separadas), V_i tiende a 0.26 ó a cero y V_e tiende a 6. Por lo que las emulsiones más estables tendrán valores altos de V_i y bajos de ϕ y V_e .

6.4.3. Determinación de desestabilización de la emulsión por coalescencia

Las emulsiones formadas por proteínas en general son muy estables y requieren varios días para su desestabilización, por lo que la evaluación del proceso de desestabilización requiere el uso de alguna fuerza que acelere el proceso. En este caso se utiliza una fuerza centrífuga.

Se preparó la emulsión como se describió antes. Se colocó en tubos de centrifuga y se centrifugó a 12000 x g durante 90 minutos. Se separó el aceite y se determinó la cantidad de aceite liberado por pesada. En los casos en que el volumen de aceite liberado fue pequeño, el mismo se absorbió con papel de filtro, en caso contrario se tomó con pipeta Pasteur. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

El porcentaje de aceite separado se calculó como:

$$\% \text{ Coalescencia} = \frac{m_1}{m_2} 100 \quad (16)$$

siendo:

m_1 = masa aceite separado luego de la centrifugación.

m_2 = masa aceite adicionada a la emulsión.

6.4.4. Determinación de la proteína retenida en la interfase

En la fase acuosa que quedó luego de la determinación de coalescencia se dosó proteína por el método de Lowry. La proteína retenida en la interfase se calculó por diferencia entre la proteína disuelta y la que queda en la fase acuosa luego de la coalescencia. A efectos de determinar si se retiene preferencialmente alguno de los componentes del aislado en la interfase se analizó mediante electroforesis la proteína remanente en la fase acuosa. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.5. Propiedades espumantes

6.5.1. Determinación de la capacidad de espumado.

Se prepararon soluciones de los aislados 1.5mg/ml en buffer fosfato 0.1M pH 7. Se colocaron en un columna de vidrio graduada que tenía en la base una placa de vidrio fritado. Se inició la formación de la espuma por burbujeo de N₂ a un flujo de 0.60 cm³/seg. A distintos tiempos se registró el volumen de espuma formado y la cantidad de líquido que se incorpora a la espuma. El burbujeo se interrumpió una vez alcanzado un volumen fijo de espuma. El volumen de líquido que se incorpora a la espuma refleja el número y distribución de tamaño de las burbujas. Esta medida es una modificación del método de Kato y col (1983 b) que utiliza la conductividad de la espuma como para evaluar esta distribución, que refleja el poder espumante de la proteína.

El volumen de líquido incorporado a la espuma disminuye en forma exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$V_t = V_0 e^{-k t} \quad (17)$$

siendo:

V_t = volumen de líquido al tiempo t (ml)

V_0 = volumen inicial de líquido (ml)

k = constante de velocidad de incorporación de líquido a la espuma (seg⁻¹)

t = tiempo transcurrido desde que se inicia el burbujeo (seg)

Los parámetros utilizados para caracterizar la capacidad de formación de una espuma fueron:

- porcentaje de líquido incorporado a la espuma: $(V_0 - V_f)/V_0 \times 100$

siendo V_f el volumen de líquido que no se incorporó a la espuma al finalizar el burbujeo.

- volumen de líquido en el equilibrio: V_e (ml) (en algunos aislados luego de un tiempo de burbujeo no se incorpora más líquido a la espuma)

- constante de incorporación de líquido a la espuma: k (seg⁻¹)

6.5.2. Determinación de la estabilidad de la espuma.

Luego de finalizado el burbujeo, durante 30 minutos, se registraron el volumen de líquido y de espuma a distintos tiempos determinándose la desestabilización por drenaje de líquido y por ruptura de la espuma.

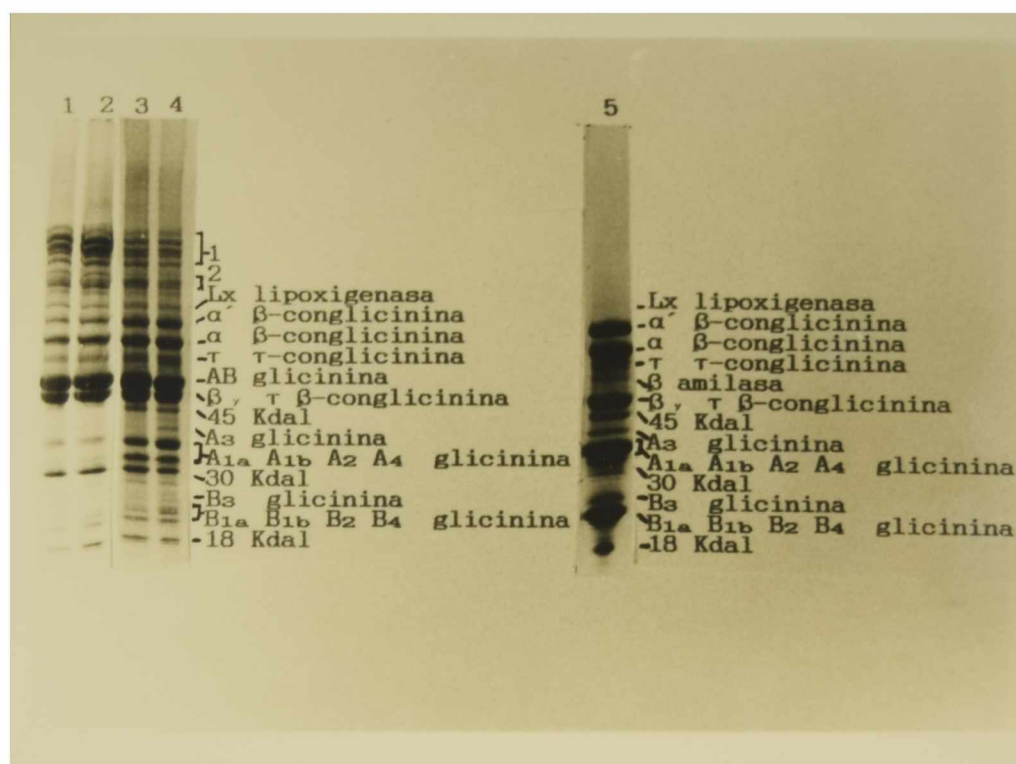
RESULTADOS Y DISCUSION

Sección 1

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

Los componentes mayoritarios de un aislado de proteínas de soja son la globulinas 7S y 11S, las cuales se encuentran acompañadas por diversos componentes minoritarios. El objetivo de esta sección es identificar algunos de los componentes que se detectan en el perfil electroforético de un aislado y las modificaciones que se producen en los mismos por cambio de pH y fuerza iónica a fin de determinar el tipo de interacciones que se establecen entre ellos.

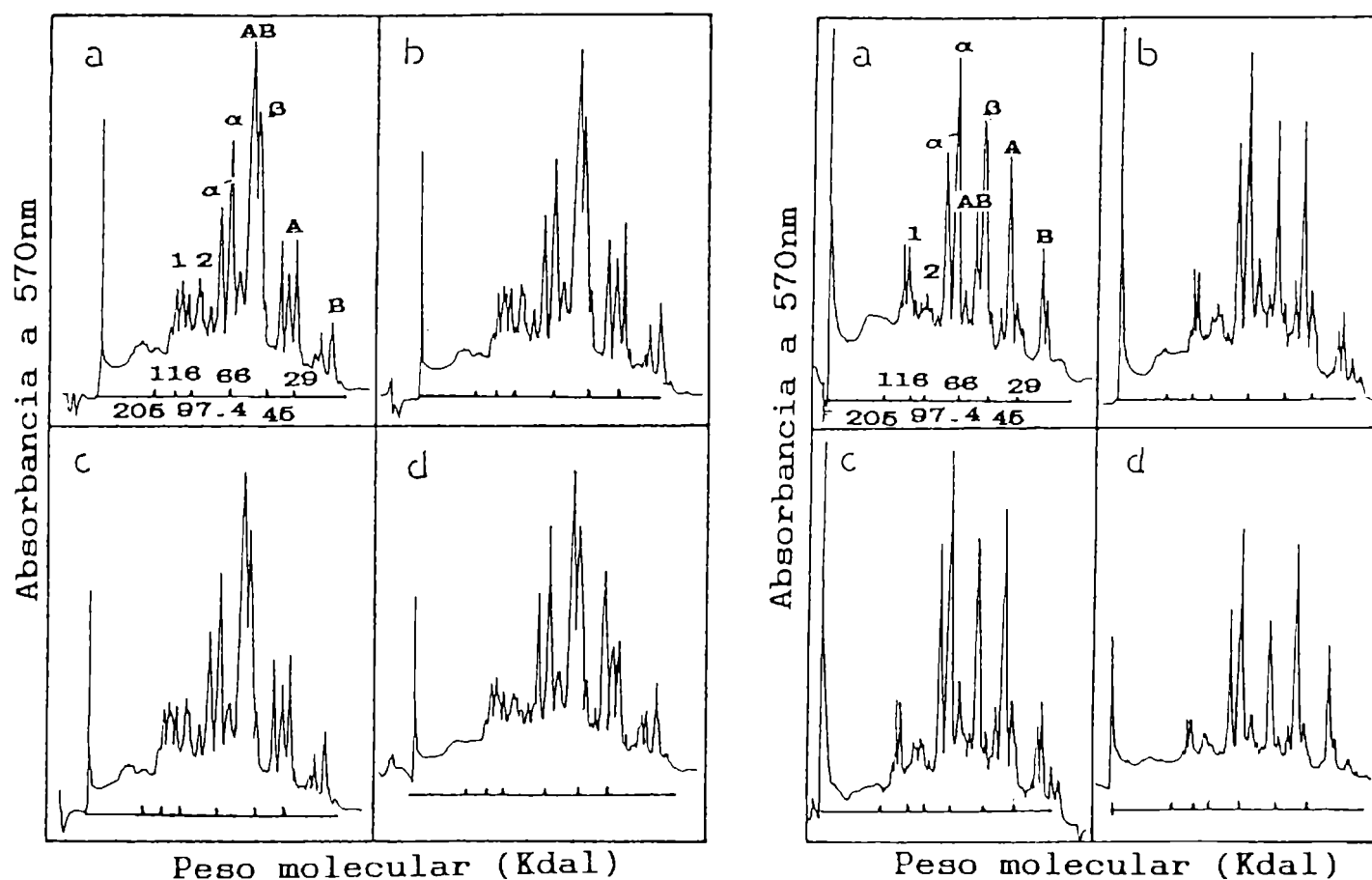


Fotografía 1: Electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%. La concentración de los aislados, previa a la liofilización, era de 10% p/v (calles 1 y 2) y 1% p/v (calles 3 y 4), respectivamente. La calle 5 corresponde a un aislado reducido con β-mercaptoetanol.

En la **Fotografía 1** se muestra una corrida electroforética típica de un gel SDS-PAGE de un aislado nativo con y sin tratamiento con β-mercaptoetanol. En la misma se han identificado los componentes presentes siendo: Lx, la lipoxigenasa; α', α, β y τ subunidades de la β-conglicinina; AB, A y B componentes de la glicinina y τ subunidad de la τ-conglicinina. En cuanto a las especies proteicas restantes la de 45 Kdal puede pertenecer a la globulina básica 7S, lo mismo que las especies de 30 Kdal (H_I y H_{II} Basic 7S Globulin) y 18 Kdal (L_I y L_{II} Basic 7S Globulin). No puede descartarse el hecho de que estas dos últimas proteínas puedan corresponder a una aglutinina y a uno de los factores antitripticos,

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

respectivamente. Las fracciones marcadas como 1 y 2 son agregados de peso molecular 100-200 Kdal, compuestos por más de ocho componentes proteicos. En presencia de β -mercaptoetanol los mismos desaparecen produciéndose un incremento de las subunidades α y α' . Una característica que presentan estos agregados es que en otras corridas electroforéticas los mismos forman cuatro bandas bien definidas (dos correspondientes a 1 y dos correspondientes a 2) o dan origen a más de diez bandas proteicas.



7.1

7.2

Figura 7: Densitogramas correspondientes a electroforesis SDS-PAGE en gradiente del 5-15 % de aislados tratados a distintos pHs a una concentración de proteína del 1% p/v, a temperatura ambiente (7.1) y a 100°C durante 90 minutos (7.2): a:pH 7 b:pH 8 c:pH 9 d:pH 10.

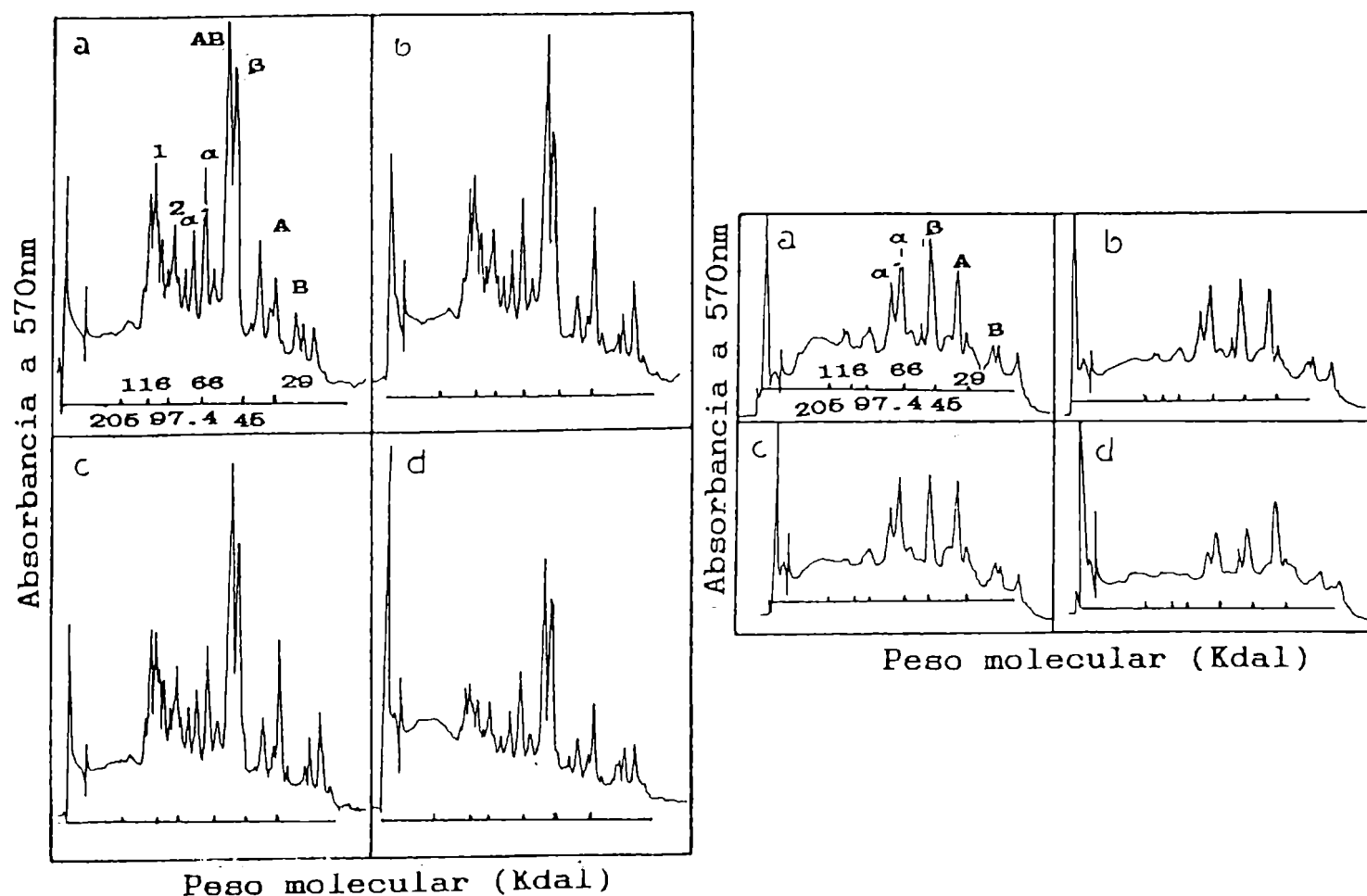
COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

Tal como se mencionara precedentemente se estudió el comportamiento de los aislados cuando se los neutraliza a pHs 7, 8, 9 y 10 sometiendo ó no a tratamiento térmico. Las **Figuras 7 y 8** muestran los densitogramas obtenidos a dos concentraciones de proteína 1 y 10% p/v, respectivamente. En el primer caso la composición proteica de los aislados neutralizados a pHs 7, 8 y 9 no mostró diferencias significativas. A pH 10 se detectó un incremento de la fracción A-11S y de la fracción de mayor peso molecular correspondiente al polipéptido B-11S (**Figura 7.1**). Estos incrementos, determinados a través de la comparación de las alturas de pico de cada fracción con respecto a la subunidad β -7S, podrían originarse en la separación de los polipéptidos A y B libres asociados a la glicinina. A esta concentración de proteínas, 1 % p/v, los tratamientos térmicos originan la formación de agregados de la fracción AB-11S a través de uniones disulfuro la que se manifiesta por la disminución de esta subunidad en los perfiles electroforéticos y la aparición de agregados que no penetran al gel. Se producirían además reacciones de intercambio entre grupos sulfhidrilos libres y uniones disulfuro que serían las responsables del incremento de las fracciones A y B por ruptura de la subunidad intermedia AB (Sathe y col 1989 y Shiga y Nakamura, 1987). También se observa una disminución de los agregados marcados en el densitograma como 2 (**Figura 7.2**).

El tamaño de los agregados de la fracción α' , α -7S, es afectado significativamente por la concentración de proteína a la que se efectúa la neutralización y posterior liofilización (**Figura 7.1 y 8.1, Fotografía 1**). A concentraciones del 10% p/v se forma una mayor cantidad de agregados debido a una mayor proximidad entre las subunidades que favorece su interacción. Estos agregados son estables ya que diluciones del aislado a concentraciones de 1; 0.1 y 0.01% p/v no modifican su proporción, la que sí es alterada por tratamientos reductores y térmicos.

Posteriormente se estudió el efecto del Na_2SO_3 , Na_2SO_4 y NaCl sobre la estabilidad de los agregados, analizándose tanto las modificaciones que se producen en los perfiles electroforéticos como los cambios en la viscosidad. Se deseaba determinar si las modificaciones producidas por el Na_2SO_3 se debían únicamente a un efecto reductor o existía también un efecto salino. Esto nos llevó a utilizar el Na_2SO_4 dado que el agregado del anión sulfato produciría un efecto de salazón ("salting out") similar al del anión sulfito. Por último se analizó el efecto de la eliminación del Na_2SO_3 agregado por lavados sucesivos.

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES



8.1

8.2

Figura 8: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal del 5-15% de aislados tratados a distintos pHs, a una concentración proteica del 10% p/v, a temperatura ambiente (8.1) y a 100°C durante 90 minutos (8.2). a:pH 7 b:pH 8 c:pH 9 d:pH 10.

La **Figura 9** muestra los densitogramas correspondientes a aislados tratados a dos concentraciones de proteína (1 y 10% p/v) y diferentes concentraciones de Na_2SO_3 (0.01; 0.1 y 1% p/v). En todos los casos el tratamiento con Na_2SO_3 fue corto, de sólo 30 minutos. Los resultados obtenidos muestran una desaparición casi completa de los agregados 1 y completa de los agregados 2 cuando existe sulfito en el medio (con excepción de la **Figura 9 a y d**). La eliminación del mismo por lavados permite una nueva formación de agregados (**Figura 10 b**), la que también se manifiesta por la mayor viscosidad observada en las dispersiones de estos aislados respecto a la mostrada en presencia de Na_2SO_3 . Estos nuevos

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

agregados son de menor tamaño que los que no sufrieron tratamiento (**Figura 11**). Se determinó también la viscosidad de soluciones al 10% (p/v) de un aislado al que se le adicionaron distintas cantidades de Na_2SO_3 (0,01; 0,1 y 1% p/v); determinándose la misma inmediatamente después de la adición de la sal y luego de 6 horas (**Figura 12**). Los resultados obtenidos muestran que la viscosidad no varía significativamente con el tiempo de tratamiento para las concentraciones más altas de reductor utilizadas (1 y 0,1% p/v), mientras que para Na_2SO_3 0,01% la viscosidad inicial del aislado es aproximadamente un 30% superior a la detectada luego de 6 horas de tratamiento.

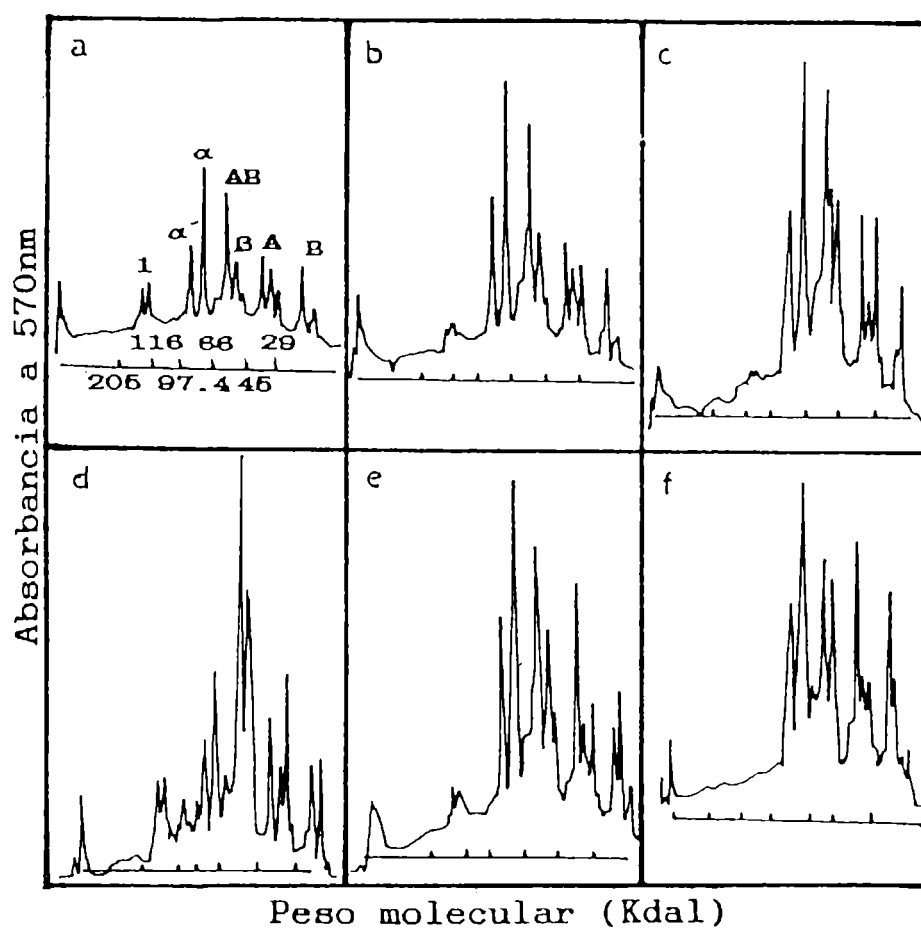


Figura 9: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal del 5-20% de aislados al 10% p/v (a; b y c) y al 1% p/v (d; e y f) tratados con Na_2SO_3 : 0,01% (a y d); 0,10% (b y e) y 1,0% p/v (c y f).

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

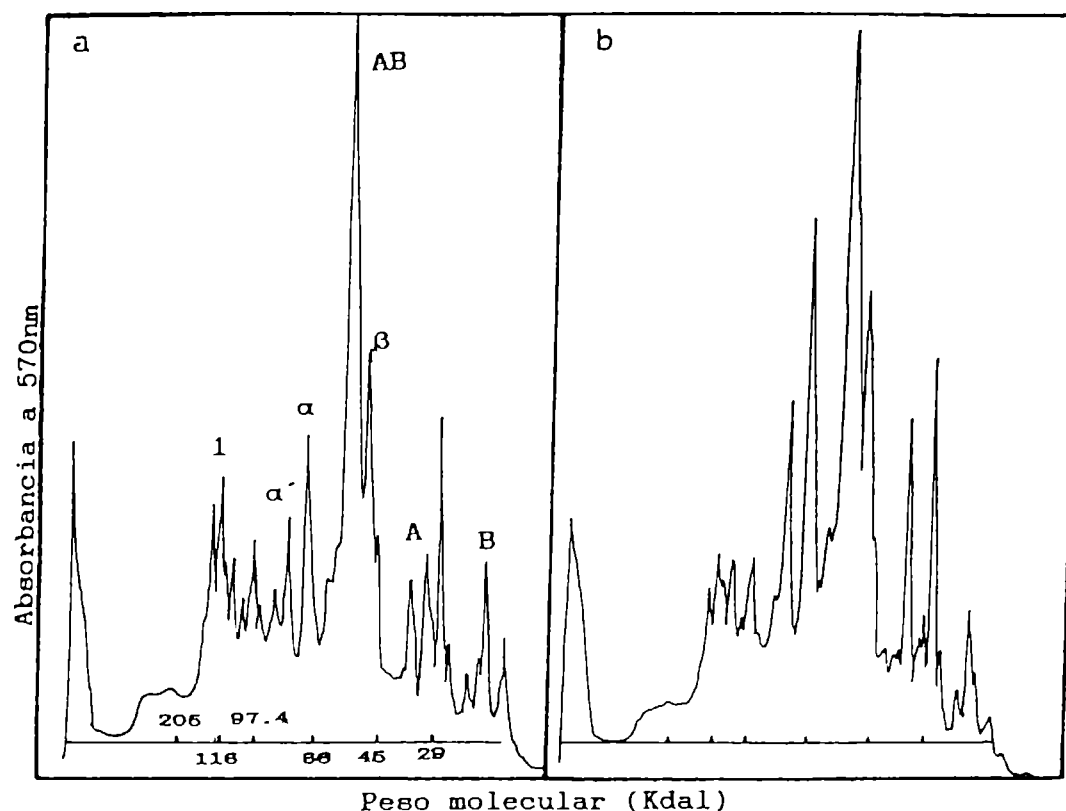


Figura 10: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal del 5-20%. a:aislado no reducido b: aislado reducido (Na_2SO_3 0.1% p/v) al que se le eliminó el sulfito por sucesivos lavados y precipitaciones isoelectricas.

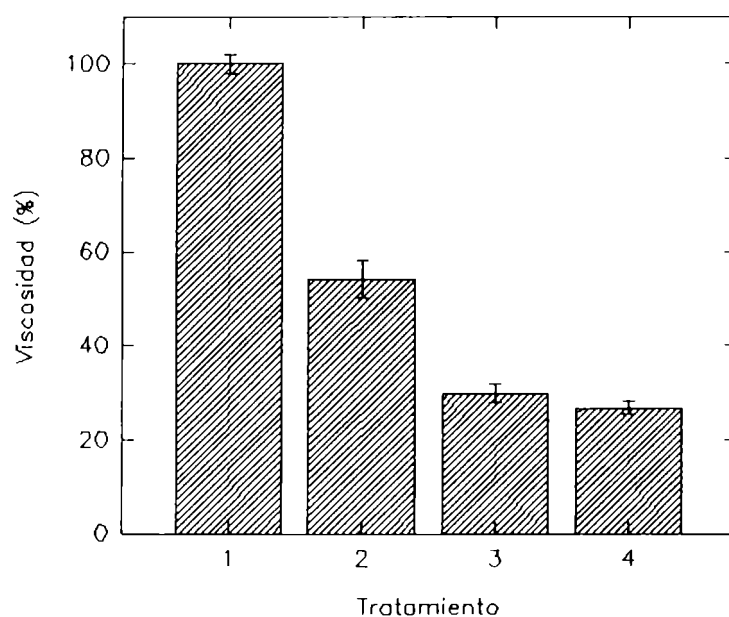


Figura 11: Viscosidad porcentual de aislados reducidos con Na_2SO_3 0.1% p/v, en relación a un aislado nativo no reducido (1). La medida se realizó inmediatamente después de agregado el reductor (3) y 6 horas después (4) ó luego de eliminado el reductor (2).

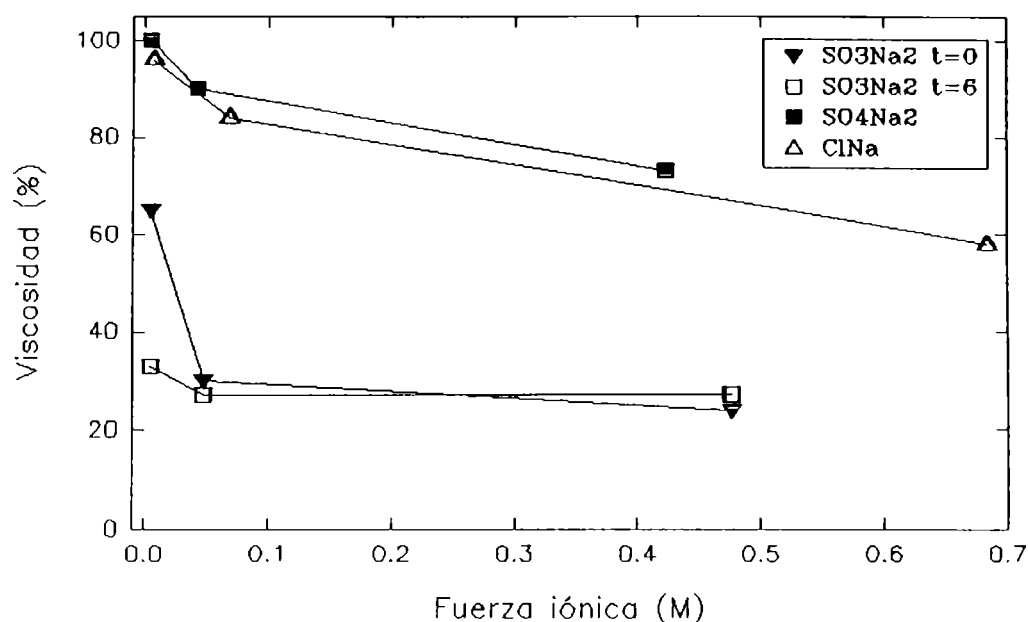
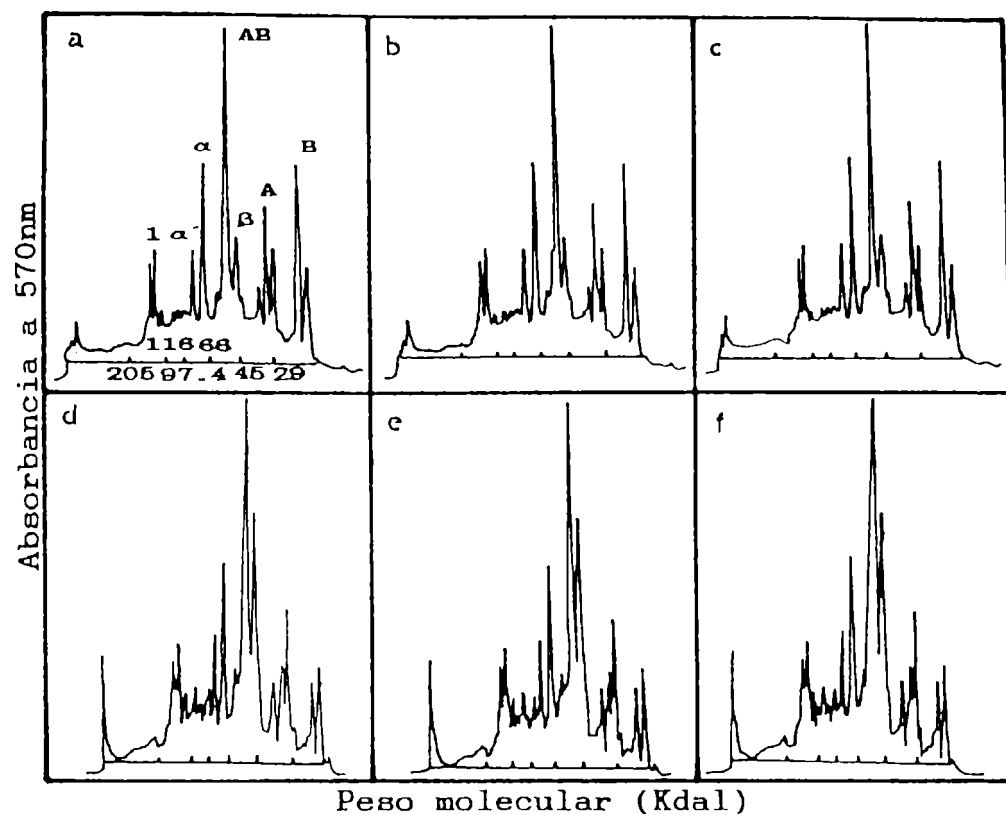


Figura 12: Efecto de la fuerza iónica en la viscosidad de un aislado nativo. La acción del Na_2SO_3 se evaluó inmediatamente después del agregado ($t=0$) y 6 horas después ($t=6$), también se muestra el efecto del agregado distintas cantidades de Na_2SO_4 y NaCl .

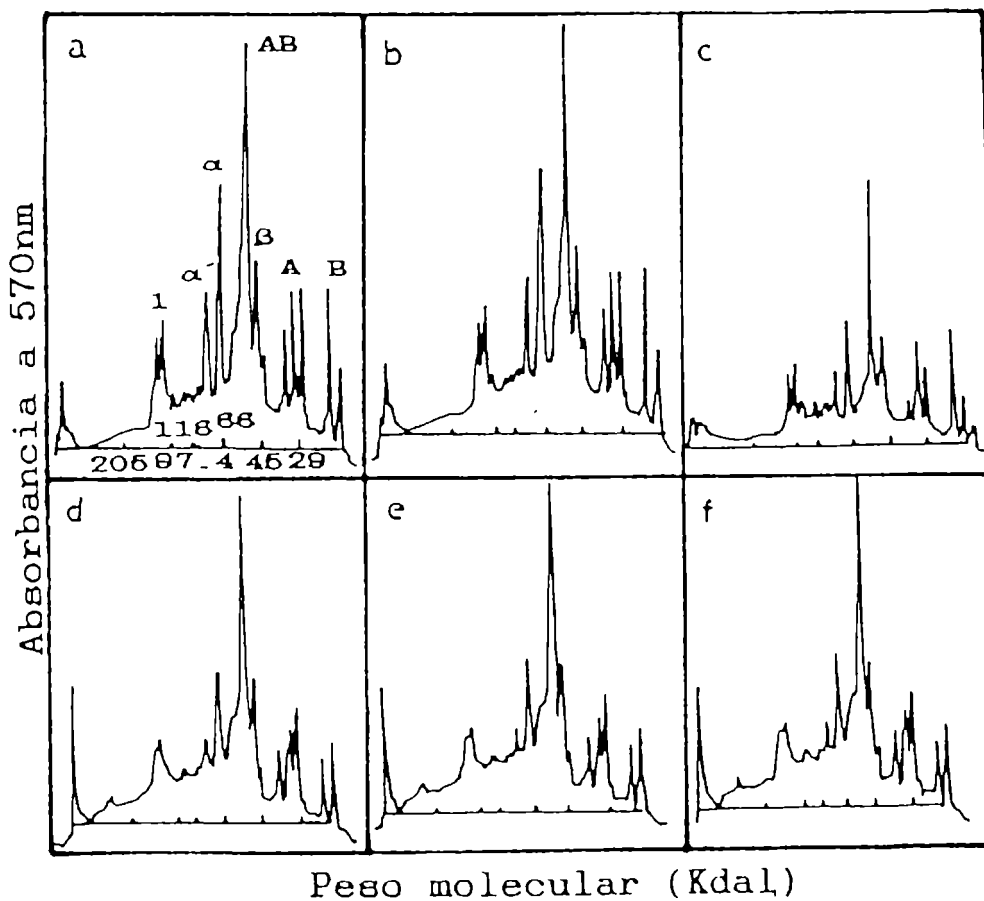
La **Figura 12** muestra también las variaciones en la viscosidad causadas por el agregado de NaCl y Na_2SO_4 , se puede observar una disminución pequeña de la misma, la que probablemente se deba a un decrecimiento de la capacidad de imbibición de agua por acción de la sal (Yao y col 1988) y no a modificaciones en el tamaño de los agregados existentes.

La comparación de las **Figuras 7.1.a y 8.1.a** con la **Figura 13** nos permite realizar el siguiente análisis. La **Figura 13.1** muestra los densitogramas correspondientes a un aislado proteico tratado con distintas cantidades de Na_2SO_4 (0.01; 0.1 y 1% p/v) a dos concentraciones de proteína: 10% p/v (**a, b y c**) y 1% p/v (**d, e y f**), respectivamente. En el primer caso la adición de Na_2SO_4 provoca un incremento de las subunidades α' y α -7S, una disminución de los agregados de peso molecular intermedio (agregados 2) y de la subunidad β -7S y un aumento de los polipéptidos A y B-11S. Para 1% p/v de proteína se observan las mismas modificaciones indicadas precedentemente pero en forma más leve, con excepción del aumento de los polipéptidos A y B-11S, que en este caso no se observa. No se detectaron diferencias entre las muestras tratadas con distintas cantidades de Na_2SO_4 .

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES



13.1



13.2

Figura 13: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal del 5-20%, de aislados al 10% p/v (a; b y c) y 1% (d; e y f) de proteína, tratados con Na_2SO_4 0,01% (a y d); 0,10% (b y e); 1% p/v (c y f) (13.1) ó con NaCl 0,02% (a y d); 0,20% (b y e); 2,0% p/v (c y f) (13.2).

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

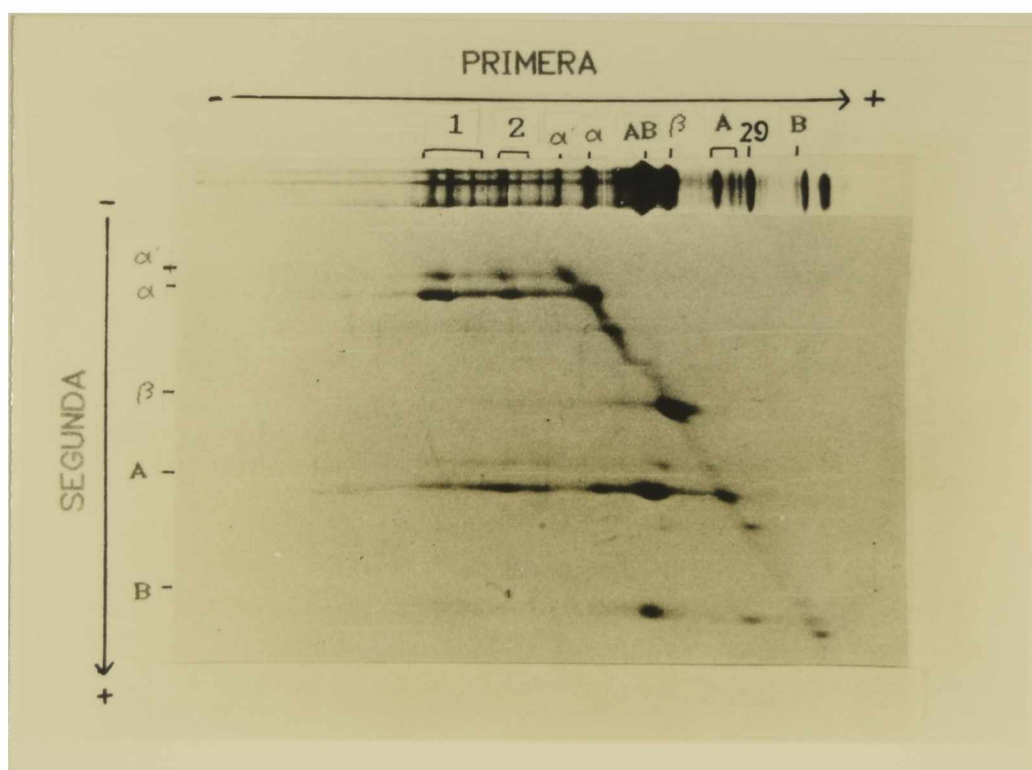
La **Figura 13.2** muestra los resultados obtenidos luego del agregado de NaCl. Para 1 % p/v de proteínas se produce la agregación de la subunidad β -7S en mayor extensión que al adicionarse Na_2SO_4 . Para la mayor concentración proteica (10% p/v) se detecta también la agregación de β -7S y las modificaciones en las subunidades α y α' -7S previamente mencionadas. No se observó incremento de los polipéptidos ácidos y básicos de la globulina 11S.

Se puede concluir que el tratamiento con NaCl y Na_2SO_4 afecta en mayor proporción a la β -conglucina produciendo un incremento de la agregación de la subunidad β y un aumento de las fracciones α' y α a costa de agregados de peso molecular intermedio (2). Hemos visto que la fracción 2 de los agregados se modifica tanto por efecto de iones como por tratamiento térmico lo que sugiere la existencia de interacciones de tipo iónico, además de uniones disulfuro en los agregados, que está de acuerdo con la alta polaridad que presentan las subunidades α y α' en el extremo NH_2 terminal (Iwabuchi y col 1991 a y b). Las interacciones de tipo hidrofóbico no se han evaluado ya que todos los cambios se siguieron a través de electroforesis en presencia de SDS.

Dado que estudios realizados por otros autores indican que las subunidades de la β -conglucina no poseen grupos sulfhidrilos libres (Badley y col 1975) y que sólo presentan dos uniones disulfuro intracatenarias (Koshiyama 1971), se procedió a determinar si no existía alguna otra proteína que formara una red a través de uniones disulfuro que mantuviera a las subunidades α y α' retenidas. A tal efecto se efectuó una electroforesis bidimensional de un aislado nativo. En la primera dimensión se empleó un gel SDS-PAGE, en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% en ausencia de β -mercaptoetanol, la segunda dimensión se realizó también en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% pero en presencia de β -mercaptoetanol. En ausencia de uniones disulfuro se espera una línea de 45°, permaneciendo los componentes estabilizados por este tipo de unión por debajo de la misma ya que la ruptura de uniones intercatenarias producirá componentes de menor peso molecular (**Fotografía 2**). Se puede observar que los agregados 1 están formados por las subunidades α' y α de la β -conglucina; en tanto que los agregados 2 contienen además el polipéptido A de la glicina. Los pesos moleculares de los agregados son 192 y 179 Kdal (para las dos bandas más intensas de 1) y 123 y 115 Kdal (para las dos especies proteicas más intensas de 2). Teniendo en cuenta que los pesos moleculares de las subunidades α' y α son 87 y 71 Kdal respectivamente, los agregados denominados 1 podrían ser dímeros o trímeros de dichas

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

subunidades. Cabe aclarar que los pesos moleculares utilizados en este análisis (tanto el de los agregados como los de las subunidades α y α') están sujetos a error pues el peso molecular de glicoproteínas determinado por electroforesis SDS-PAGE se sobreestima. Dichas proteínas tienen disminuida su afinidad por el SDS debido a la presencia de restos glicosídicos, por lo que la relación carga/masa es inferior al de una proteína no glicosilada, además las glicoproteínas interactúan con la matriz de poliacrilamida a través de puentes de hidrógeno lo que también disminuye su movilidad electroforética (Poduslo y col 1981). Según datos bibliográficos la β -conglucininina presentaría dos formas en las cuales no participaría la subunidad β a saber: B_5 compuesto por $\alpha_2\alpha'$ y B_6 compuesto por α_3 (Thanh y Shibasaki, 1976 a; 1978 y 1979; Yamauchi y col, 1981; Sykes y Gayler, 1981). Sin embargo, según estos autores, las fuerzas responsables de la formación de estos trímeros son de tipo electrostáticas.

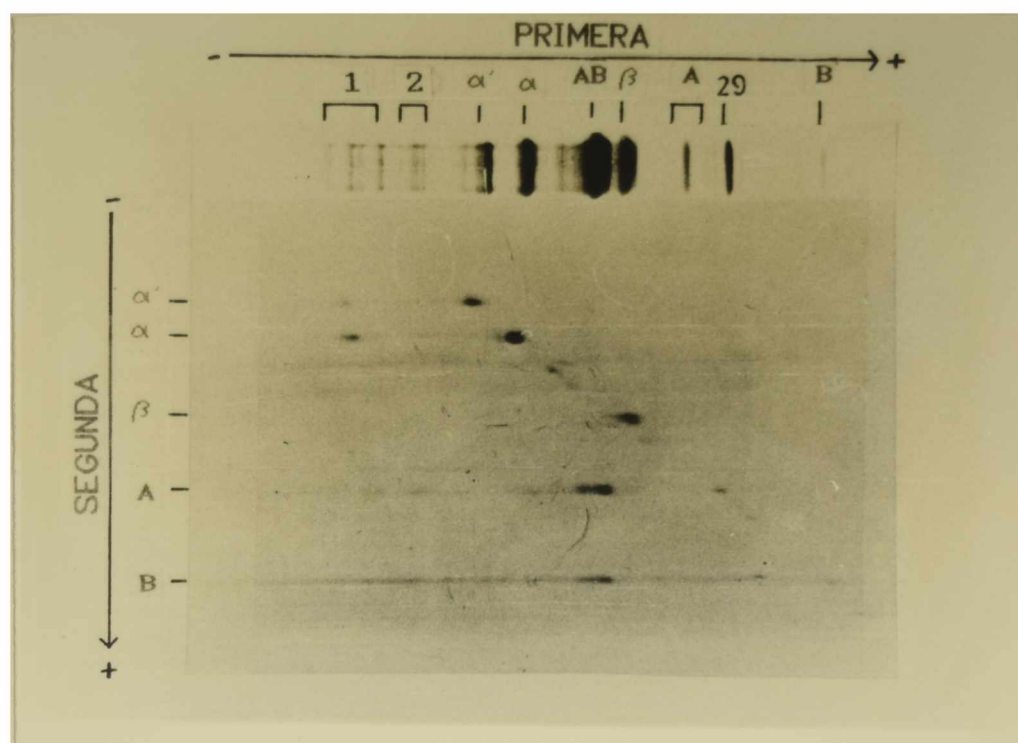


Fotografía 2: Electroforesis bidimensional de un aislado nativo. Primera dimensión SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15 %. Migración de izquierda a derecha. Segunda dimensión SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15 % en presencia de β -mercaptoetanol. Migración de arriba hacia abajo.

La **Fotografía 3** muestra un aislado al que se lo sometió a un tratamiento reductor (Na_2SO_3 0.1 % p/v) realizándose la corrida bidimensional en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Se puede observar que la reducción produce un incremento de la subunidades

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

α y α' cuya intensidad supera a la de los agregados, hecho que no se observó en el aislado nativo. También se detecta que los agregados 2 son los más afectados por la reducción.



Fotografía 3: Electroforesis bidimensional de un aislado que se redujo con Na_2SO_3 0.1% y el mismo se eliminó por sucesivos lavados. Primera dimensión SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%. Migración de izquierda a derecha. Segunda dimensión SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% en presencia de β -mercaptoetanol. Migración de arriba hacia abajo.

El análisis de los resultados obtenidos indica que los agregados 1 y 2 se encuentran estabilizados por uniones disulfuro y que las modificaciones en la fuerza iónica les produce cambios en su conformación que originan modificaciones en su movilidad electroforética. Los agregados 1 serían dímeros o trímeros de las subunidades α' y α estabilizados por uniones disulfuro intercatenarias, mientras que los agregados 2 estarían constituidos por el polipéptido A y las subunidades α y α' -7S pudiendo el primero formar una red entre estas últimas. La estabilidad de los agregados 2 es inferior a la de los agregados 1, ya que la adición de Na_2SO_3 , Na_2SO_4 y NaCl o el tratamiento térmico produce su desaparición, mientras que los agregados 1 mantienen su proporción. La presencia de SDS no afecta la estructura de los mismos por lo que interacciones de tipo hidrofóbico no formarían parte de las fuerzas que permiten la formación y el mantenimiento de su estructura. Se ha observado que estos agregados también se encuentran presentes en la harina de soja.

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

En la **Fotografía 2** se observa también la presencia de otros componentes con uniones disulfuro intercatenarias: una proteína de peso molecular aproximado 56 Kdal, que se encuentra entre las subunidades AB (58 Kdal) y β (54 Kdal) que origina por reducción un componente de 37 Kdal y otro de 30 Kdal; y otra proteína de peso molecular inferior al polipéptido A de la fracción 11S que origina un componente de 18 Kdal.

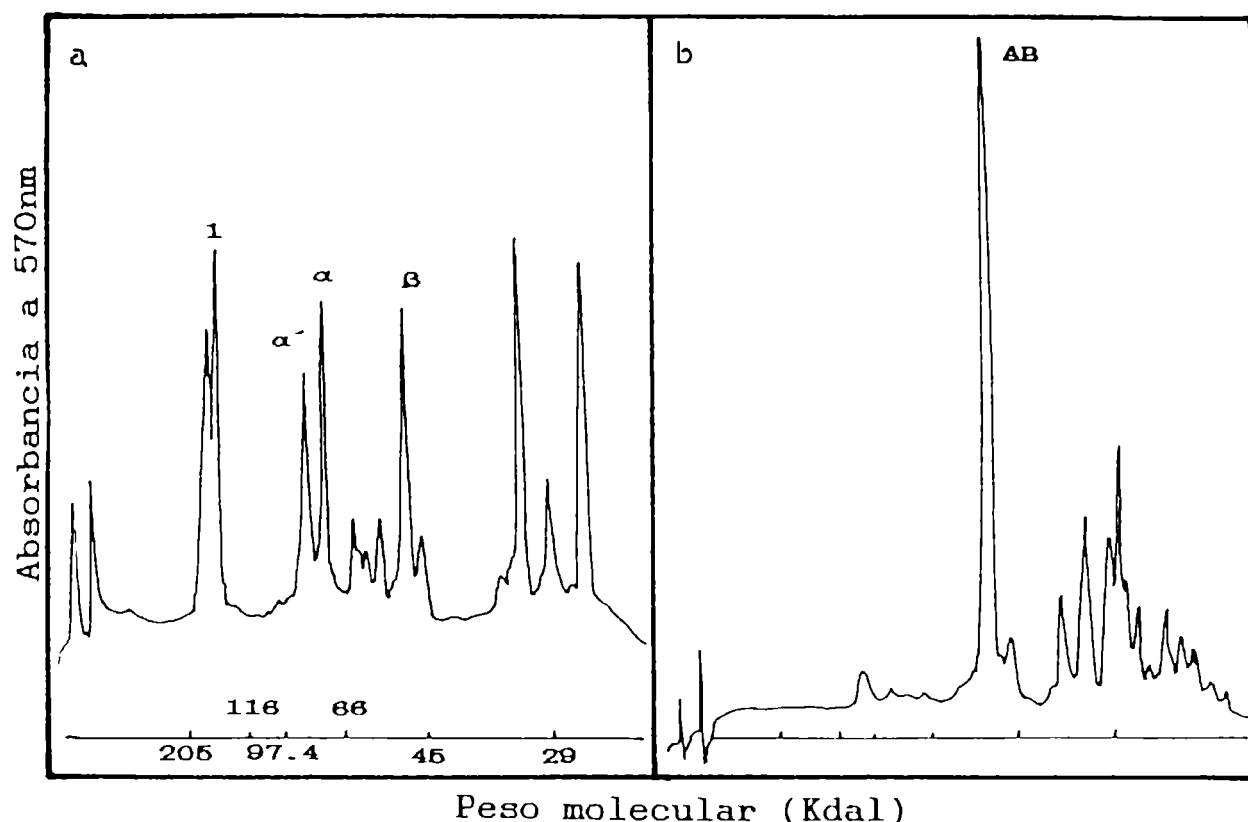


Figura 14: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%: fracción 7S cruda (β -conglícinina) (a); fracción 11S cruda (glícinina) (b).

Con el objeto de caracterizar el comportamiento de los distintos componentes presentes en el aislado, se realizaron también electroforesis ácidas y alcalinas. Se utilizaron las fracciones 7S y 11S crudas obtenidas por el método de Thanh y Shibasaki (1976 b) como muestras de referencia. Los perfiles electroforéticos correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE de las mismas se muestran en la **Figura 14**. Se observa que la globulina 7S presenta los agregados 1 y las subunidades α' , α y β como componentes mayoritarios y en menor proporción algunas proteínas del suero y de la fracción 11S. La glícinina prácticamente no se halla contaminada con componentes de la fracción 7S.

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

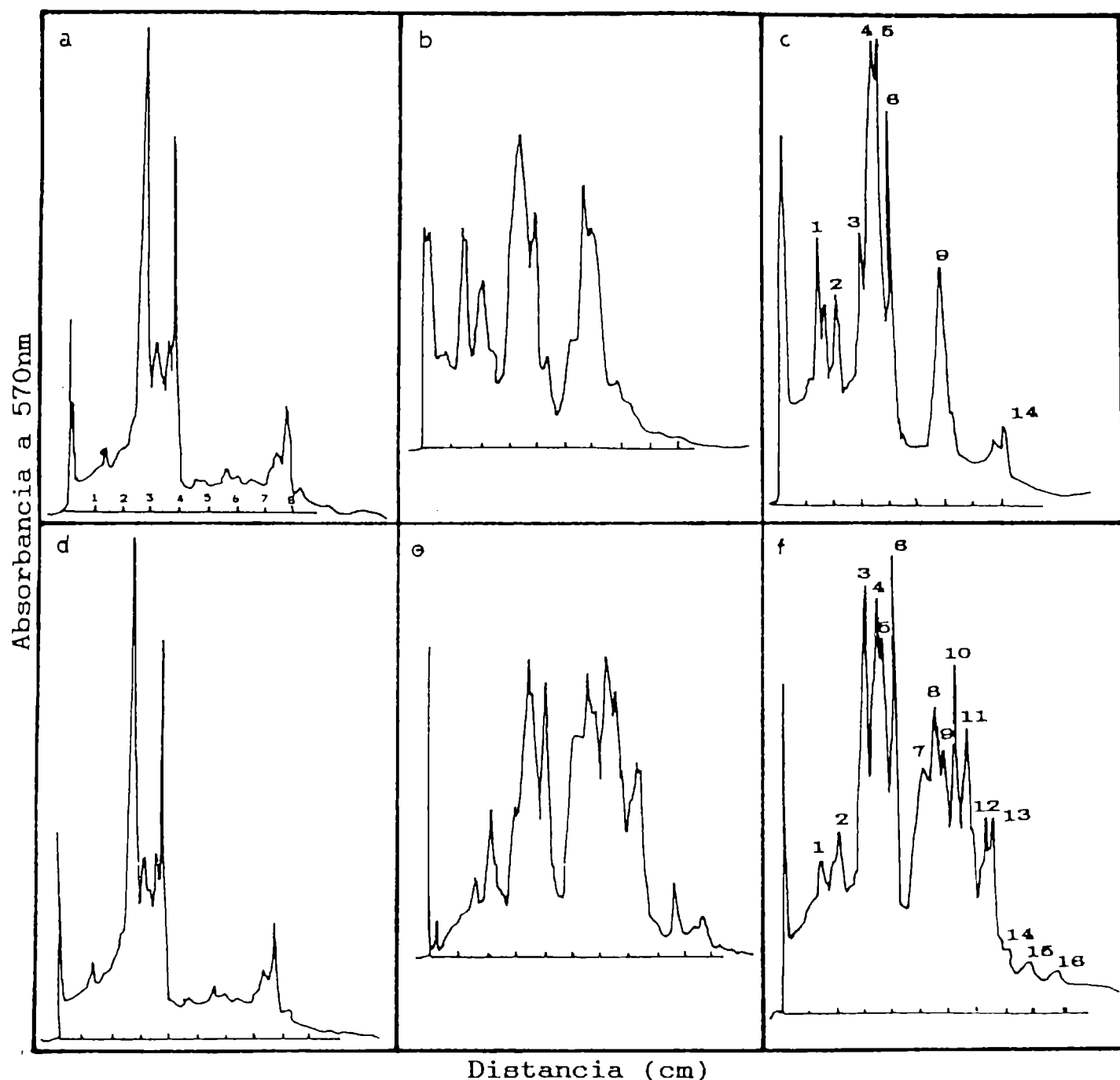
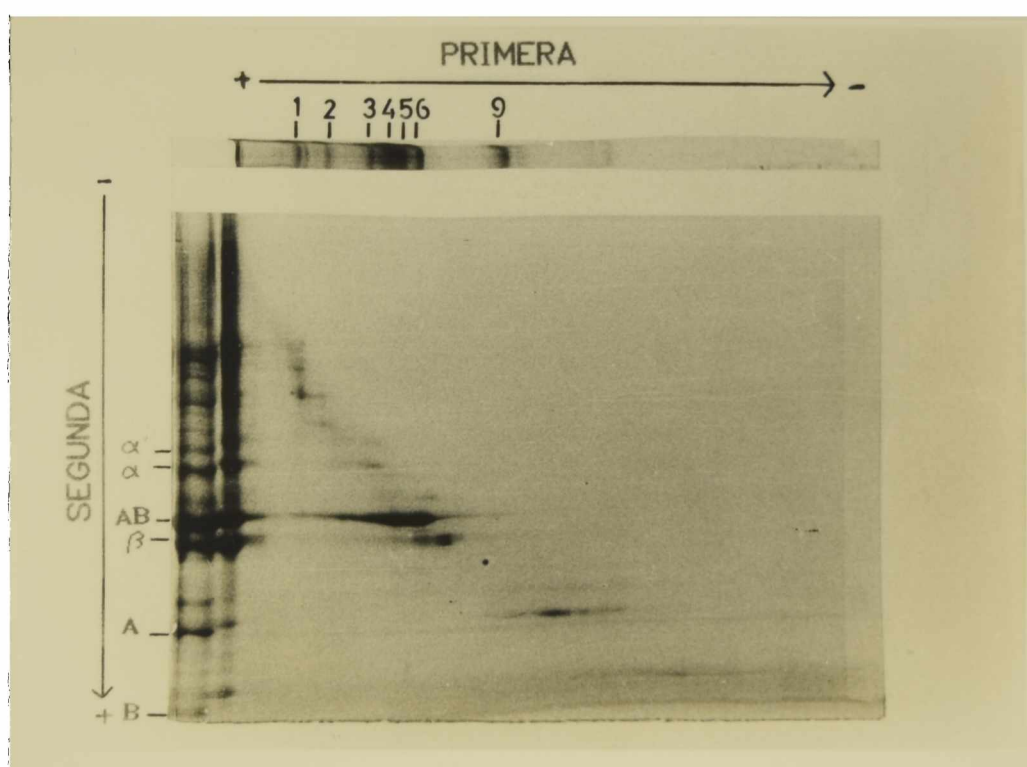


Figura 15: Densitogramas correspondientes a una electroforesis ácida. Las partes a, b y c de la figura corresponden a las fracciones 7S y 11S y a un aislado nativo sin tratamiento reductor respectivamente. Las partes d, e y f corresponden a las mismas fracciones pero reducidas con β -mercaptoetanol.

En la **Figura 15** se muestran los perfiles electroforéticos correspondientes a un gel ácido (acrilamida 7.5%, urea 7M y ácido acético 10%) de las fracciones 7S, 11S y de un aislado nativo corridos en presencia y en ausencia de β -mercaptoetanol. Las bandas se numeraron en orden creciente de movilidad. La fracción 7S muestra dos componentes mayoritarios

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

marcados como 3 y 6; en menor proporción se encuentran las bandas 4 y 5. La fracción 11S presenta numerosos componentes: los componentes 4, 5 y 9 son los mayoritarios; cuando se la reduce se observa una pequeña disminución de los componentes 4 y 5 y un incremento notable de las proteínas de mayor movilidad electroforética. En estas condiciones de corrida se logra una buena separación de las fracciones de bajo peso molecular, obteniéndose una mayor heterogeneidad para estas fracciones, que la observada en una electroforesis SDS-PAGE. El aislado nativo tanto en presencia como en ausencia de β -mercaptoetanol resulta ser combinación de los perfiles de 7S y 11S. Las proteínas en este aislado se numeraron en orden creciente de movilidad electroforética con el fin de facilitar el análisis.



Fotografía 4: Electroforesis bidimensional de un aislado nativo. Primera dimensión: electroforesis ácida en ausencia de β -mercaptoetanol. Migración de izquierda a derecha. Segunda dimensión: SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%. Migración de arriba hacia abajo. Las proteínas se identificaron, en la primera dimensión, en orden creciente de movilidad electroforética. En la segunda dimensión se corrió además un aislado nativo no reducido como muestra de referencia.

Para identificar los distintos componentes se realizó una electroforesis bidimensional de un aislado nativo corrido en la primera dimensión en un gel ácido, en presencia o no de

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

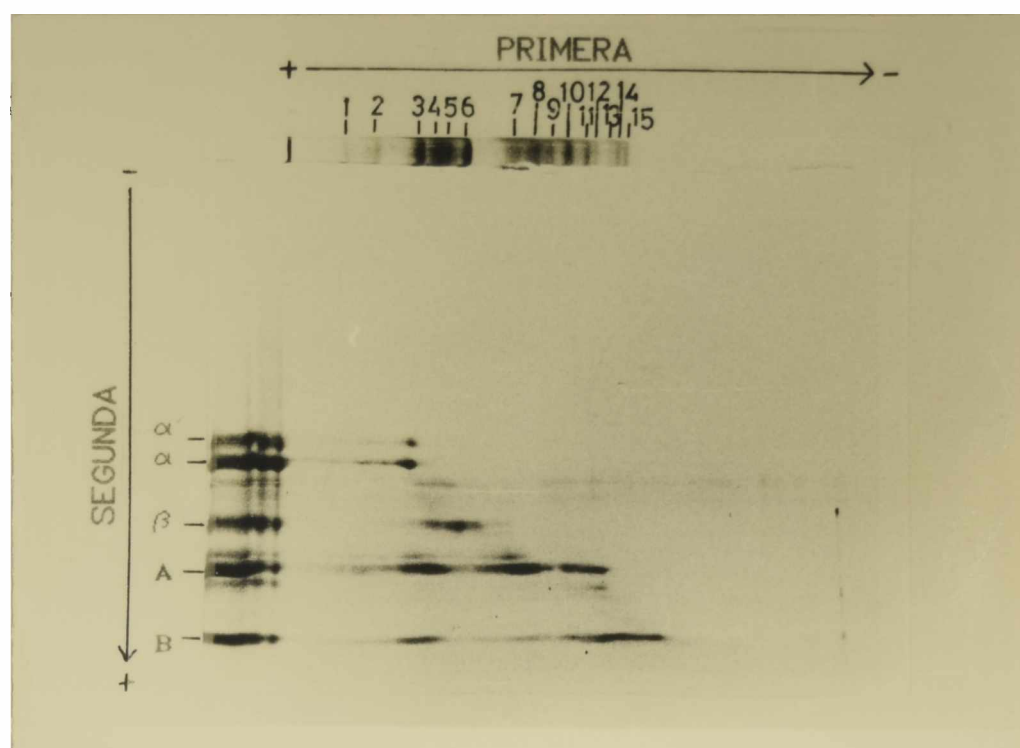
β -mercaptoetanol. En la segunda dimensión se realizó una electroforesis SDS-PAGE en presencia de β -mercaptoetanol si este se había utilizado en la primera dimensión, o en su ausencia en caso contrario. En la **Fotografía 4** se muestra el resultado obtenido para un aislado sin tratamiento con β -mercaptoetanol. Se observa que las bandas marcadas como 1 y 2 corresponden a los agregados de α' y α denominados anteriormente 1 y 2. La banda 3 corresponde a las fracciones α y α' que en la electroforesis ácida presentan igual movilidad electroforética. Los picos 4 y 5 dan una banda ancha cuyo peso molecular coincide con la proteína AB. El 6 corresponde a la fracción β -7S y el 9 al polipéptido A-11S. La **Fotografía 5** muestra que la reducción de la subunidad AB del aislado tratado con β -mercaptoetanol no ha sido completa, este hecho se puede atribuir a la disminución del poder reductor del β -mercaptoetanol en medio ácido. Se observa que hubo reducción por el incremento en las bandas de mayor movilidad electroforética: las bandas 7; 8 y 9 que corresponden al polipéptido A; las 10 y 11 que en la segunda dimensión muestran componentes tanto en la zona de A como de B; y las bandas 12 y 13 que corresponden al polipéptido B. El aislado nativo presenta a este pH y en presencia de urea 7M, tanto en presencia o ausencia de β -mercaptoetanol, agregados incapaces de entrar al gel, que sí penetran al realizar la segunda dimensión con SDS; los mismos presentan todos los componentes del aislado.

A fin de incrementar el poder reductor del β -mercaptoetanol en medios de urea 7M y HCl 0.1M, se efectuó el tratamiento con β -mercaptoetanol a pH 8.5 llevándose luego a medio ácido; o bien la muestra se hirvió unos minutos. En ambos casos se observó la completa desaparición de las bandas 1; 2; 4 y 5 comprobándose que su presencia se debe a una reducción incompleta, que se completa por tratamiento térmico o cambio de pH (**Figura 16**).

La electroforesis ácida permite resolver a la subunidad AB en dos bandas y a los polipéptidos A y B en numerosas fracciones, algunas de las cuales tienen igual movilidad electroforética. Esta separación no se logra en geles SDS-PAGE. Las proteínas α y α' en estas condiciones dan origen a una única banda. Cuando el aislado no se ha tratado con β -mercaptoetanol en la segunda dimensión se obtiene una línea de 45°, lo que está indicando que la separación en la primera dimensión está siendo determinada por el tamaño molecular. En presencia de β -mercaptoetanol existen desviaciones de esta línea, pues se completa la reducción de AB y existen a su vez zonas donde A y B presentan igual movilidad. Esto último puede explicarse por las diferencias de tamaño de los distintos componentes de estas fracciones ($A_3 \approx 40$ Kdal; A_{1a} , A_{1b} y $A_2 \approx 34$ Kdal; $A_5 \approx 10$ Kdal y $B \approx 18$ Kdal) y las

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

diferencias de punto isoeléctrico (A entre 4.75 y 5.40 y B entre 8 y 8.5) (Badley y col 1975, Kitamura y col 1976, Mori y col 1979, Staswick y col 1981, 1984).



Fotografía 5: Electroforesis bidimensional de un aislado nativo reducido con β -mercaptoetanol. Primera dimensión: electroforesis ácida en presencia de β -mercaptoetanol. Migración de izquierda a derecha. Segunda dimensión: SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%. Migración de arriba hacia abajo. Las proteínas se identificaron, en la primera dimensión, en orden creciente de movilidad electroforética. En la segunda dimensión se corrió además un aislado nativo reducido con β -mercaptoetanol como referencia.

También se realizó una electroforesis a pH 8.5 en presencia de urea 7M, los perfiles electroforéticos correspondientes a la fracción 7S, 11S y al aislado nativo con/sin tratamiento con β -mercaptoetanol se muestran en la **Figura 17**. Al igual que lo observado en las electroforesis ácidas se nota una mejor definición de las proteínas de bajo peso molecular. La fracción 7S muestra dos picos importantes, tanto en presencia como en ausencia de β -mercaptoetanol. La fracción 11S presenta un pico muy intenso que es reducido por el β -mercaptoetanol. El aislado nativo presenta siete picos que se numeraron en orden creciente de movilidad. De acuerdo a los resultados obtenidos en la electroforesis bidimensional (**Fotografía 6**) los mismos corresponderían a: 1 a los agregados 1 y 2 de las subunidades α

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

y α' ; 2 a la subunidad β -7S; 3 a la subunidad AB-11S; 4 a las subunidades α' y α ; 5 y 6 al polipéptido A y 7 al polipéptido B. Se observa que la subunidad intermedia AB presenta varios componentes de distinta movilidad, siendo el mayoritario el marcado como 3, teniendo el resto de los componentes movilidades entre esta banda y las que poseen una movilidad levemente superior a α' y α (banda 4). El aislado nativo tratado con β -mercaptoetanol presenta en la primera dimensión una serie de especies proteicas que también se numeraron en orden creciente de movilidad de 1-6, los mismos se identificaron al efectuar la segunda dimensión como: 1 polipéptido B-11S; 2 subunidad β -7S; 3 subunidades α' y α ; 4 5 y 6 polipéptidos A-11S.

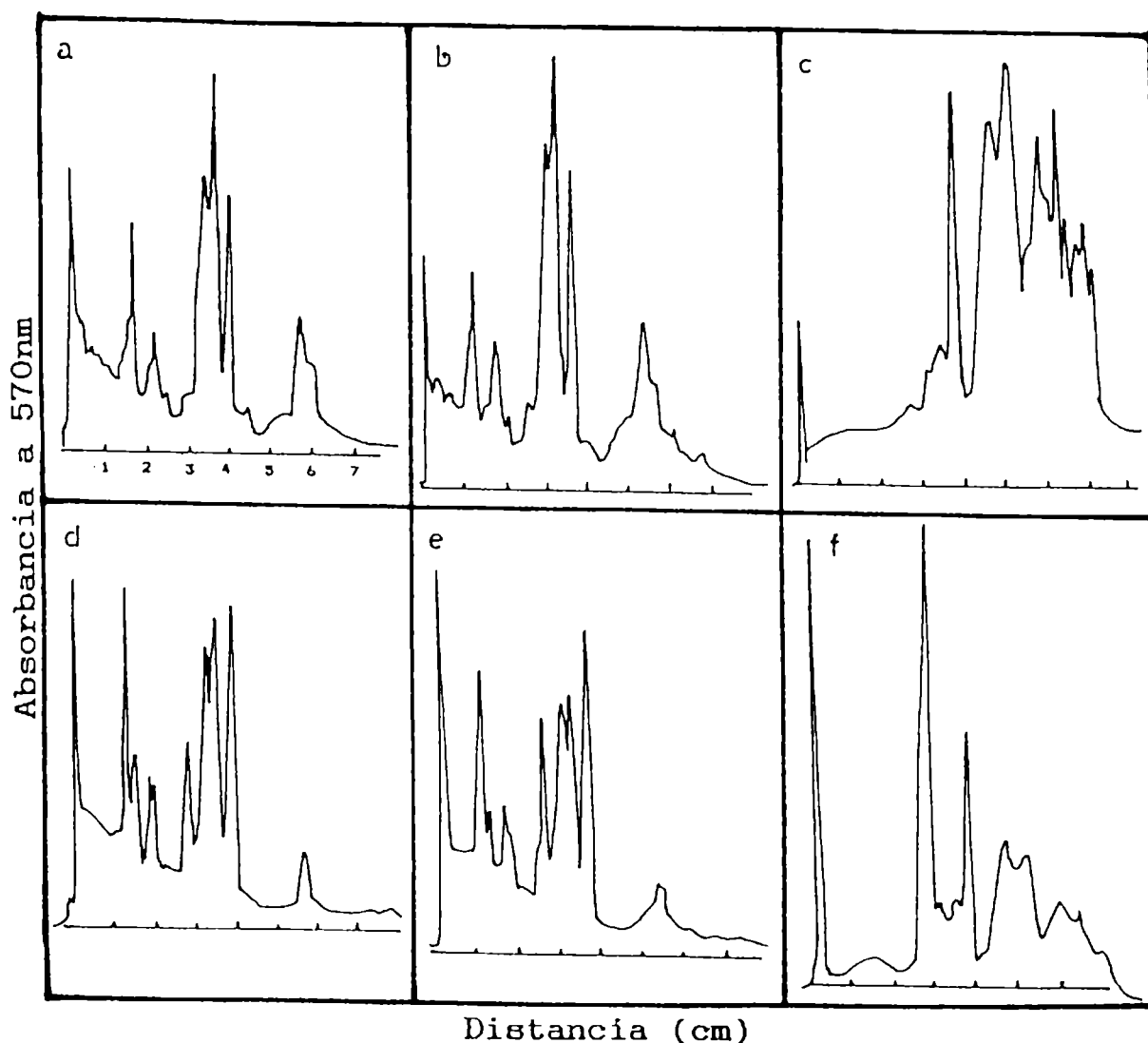


Figura 16: Densitogramas correspondientes a una electroforesis ácida. Las partes a, b y c corresponden a la fracción 11S y las d, e y f a un aislado nativo. a y d no tienen tratamiento reductor; b y e se redujeron con β -mercaptoetanol en medio ácido sin tratamiento térmico y c y f se redujeron con β -mercaptoetanol calentando unos minutos a ebullición.

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

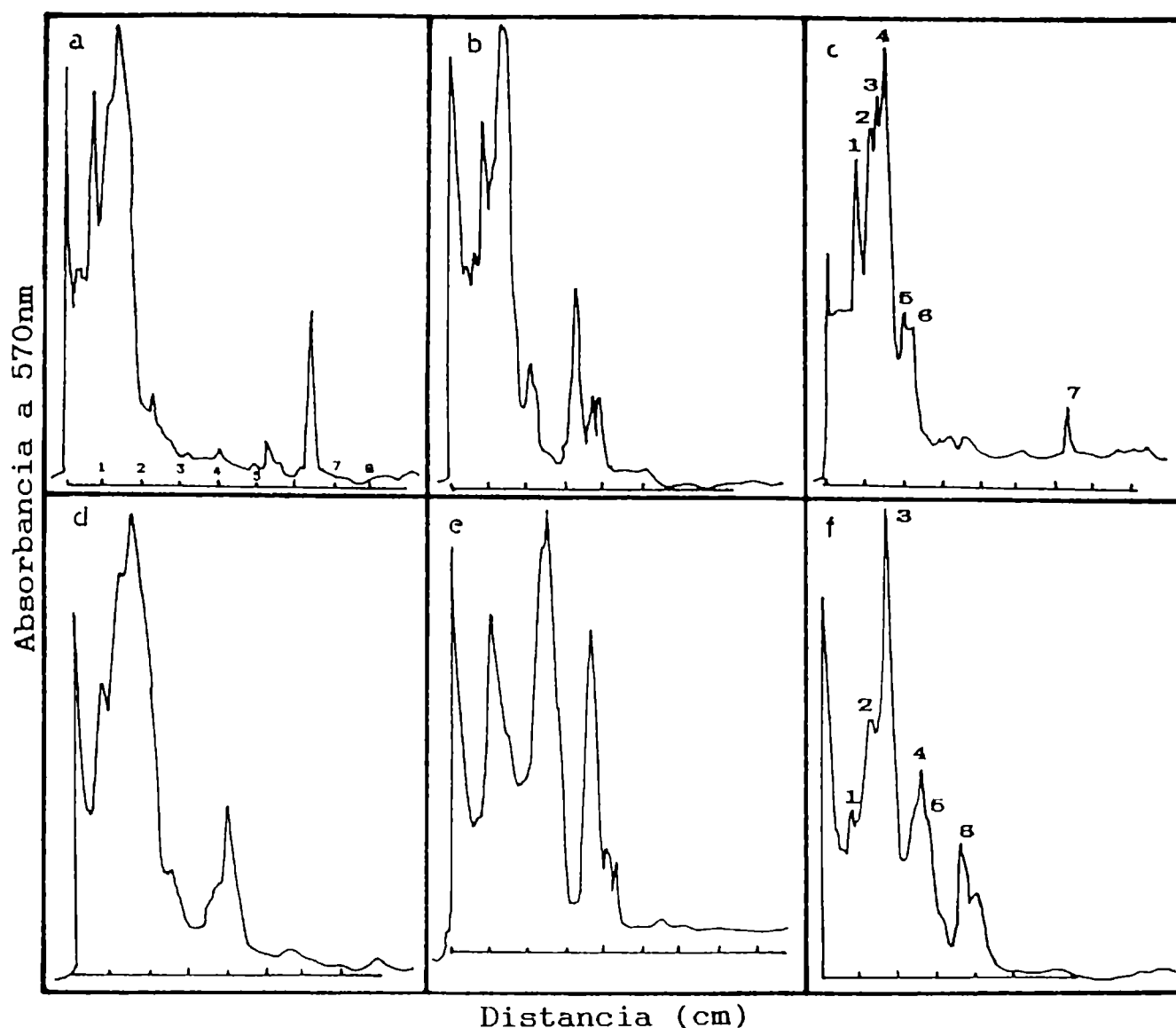
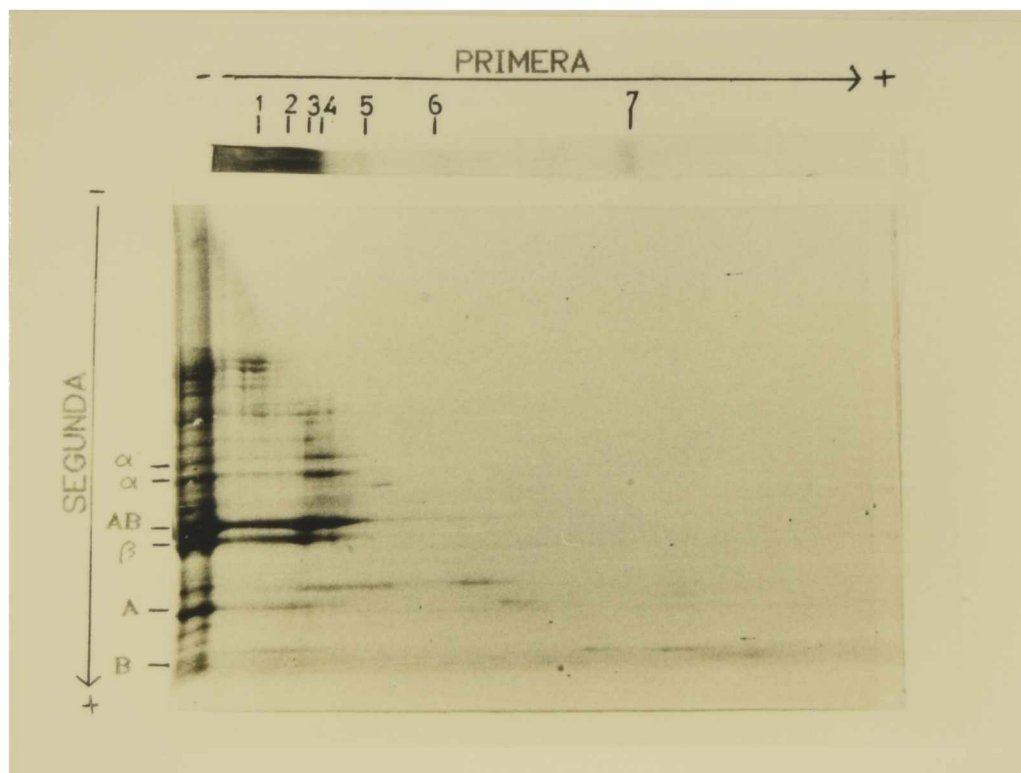


Figura 17: Densitogramas correspondientes a una electroforesis alcalina a pH 8.5. Las partes a, b y c corresponden a las fracciones 7S y 11S y al aislado nativo, respectivamente. Las partes d, e y f corresponden a las mismas fracciones pero reducidas con β -mercaptoetanol. Las proteínas se numeraron en orden creciente de movilidad electroforética.

Como se observa, en el caso de aislados reducidos con β -mercaptoetanol (**Fotografía 7**), las fracciones de menor movilidad electroforética son las subunidades B-11S (cuyo PM 18-20 Kdal y PI 8-8.5) y la β -7S (cuyo PM 48 Kdal y PI 5.8). La baja movilidad de la fracción β -7S es coincidente con lo encontrado por Utsumi y col (1984) aunque la misma llama la atención ya que es menor que la de las subunidades α y α' cuyo peso molecular aproximado es 70 Kdal y PI 5.2-5.3. En el aislado reducido el polipéptido B también presenta una baja movilidad pero nos encontramos cerca de su punto isoeléctrico. Se efectuó un incremento del pH de 8.5 a 10.5 para ver si se lograba incrementar la movilidad, pero el mismo no dio

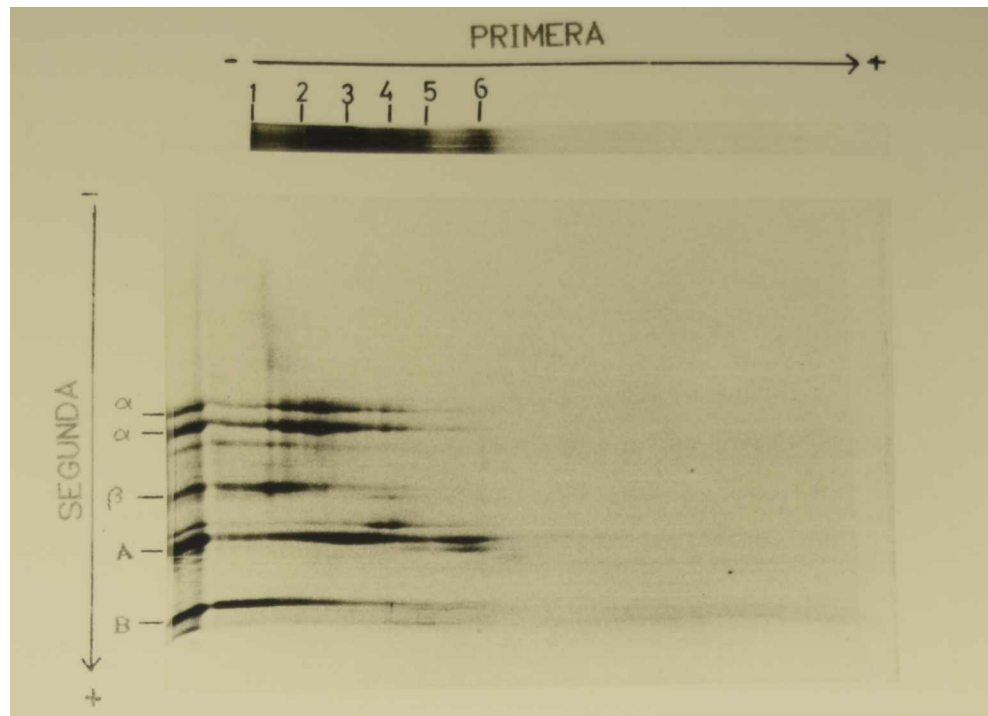
COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

resultado. En aislados no reducidos este polipéptido presenta una gran movilidad electroforética, pero su reducción produce una disminución de la misma (banda 7 del aislado no reducido), la que puede ser atribuida a la ruptura de una unión disulfuro intracatenaria que produzca la exposición de grupos hidrofóbicos y agregación, aunque estamos en un medio que tiene urea 7M. La variación de la movilidad electroforética no puede ser atribuida a un cambio en la carga de la proteína ya que al reducir se introducen únicamente grupos sulfhidrilos libres cuyo pK es aproximadamente 9, lo que no puede modificar sustancialmente la misma.



Fotografía 6: Electroforesis bidimensional de un aislado nativo. Primera dimensión: electroforesis alcalina a pH 8.5. Migración de izquierda a derecha. Segunda dimensión: SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%. Migración de arriba hacia abajo. Las proteínas se numeraron, en la primera dimensión, en orden creciente de movilidad electroforética. En la segunda dimensión se corrió un aislado nativo como muestra de referencia.

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES



Fotografía 7: electroforesis bidimensional de un aislado nativo reducido con β -mercaptoetanol. Primera dimensión: electroforesis alcalina a pH 8.5 en presencia de β -mercaptoetanol. Migración de izquierda a derecha. Segunda dimensión: SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%. Migración de arriba hacia abajo. Las proteínas, en la primera dimensión, se numeraron en orden creciente de movilidad electroforética. En la segunda dimensión se corrió un aislado nativo reducido como muestra de referencia.

La baja movilidad de las especies proteicas B y β puede deberse a que su composición aminoacídica es tal que a este pH no tienen grupos capaces de ionizarse o bien a que están ocurriendo reacciones de agregación. En el caso del polipéptido B luego de la reducción se producen reacciones de agregación. En el caso de la subunidad β -7S la reducción no afecta su comportamiento, pero es probable que haya sufrido agregación, ya que aún con el incremento del pH sigue teniendo una movilidad inferior a α y α' , a pesar de tener un peso molecular menor. Este comportamiento está denotando una homología estructural entre ambas proteínas lo que puede explicar la tendencia que presentan a formar agregados β -B (Utsumi y col 1984). Este comportamiento puede ser producido por interacciones hidrofóbicas. Se ha informado que ambas subunidades presentan alta hidrofobicidad (German y col 1982,

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

Damodaran y Kinsella, 1982, Utsumi y col 1984, Iwabuchi y col 1991 a y b).

En las electroforesis alcalinas se continua observando la presencia de los agregados 1 y 2 de las subunidades α y α' , lo que da cuenta de su estabilidad a este pH. Lo mismo se observó en medio ácido. Además en ambos medios las subunidades α y α' de la β -conglucina poseen la misma relación carga/masa.

CONCLUSIONES.

Los agregados que forman las subunidades α' y α -7S presentan tanto interacciones iónicas como uniones disulfuro. Los agregados 1 están formados por las subunidades α' y α en forma dimérica o trimérica; mientras que los agregados 2 están formados por las subunidades α' y α y por el polipéptido A. Estos últimos son más sensibles a cambios de fuerza iónica y tratamientos térmicos. La proporción de α' y α del aislado que forma parte de estos agregados es fuertemente dependiente de las condiciones de liofilización, que determina el número de componentes de peso molecular entre 100-200 Kdal que formarán parte del aislado (varía entre 4 y más de 10). Estos agregados se reducen fácilmente en presencia de Na_2SO_3 , aún a bajas concentraciones y en ausencia de desnaturalizantes, por lo que las uniones disulfuro involucradas son accesibles. Otra característica que presentan estos agregados es que luego de eliminado el reductor ocurren reacciones de reoxidación y reformación de los mismos. Se comprobó además que son estables a distintos pHs, en presencia de SDS y de urea. Este resultado no está de acuerdo con lo informado por Iwabuchi y col 1991, quienes indicaron que los agregados de la β -conglucina que están formados por las subunidades α y α' únicamente, son los más sensibles a cambios en la fuerza iónica y que dichas subunidades se disocian en las condiciones electroforéticas. Esta gran estabilidad determina la necesidad que las interacciones entre α y α' en los mismos sea a través de uniones disulfuro, ya que aunque en el caso del agregado 2 la presencia del polipéptido A podría formar una red entre dichas subunidades, las variaciones importantes de pH así como la presencia de urea podrían liberarlas.

El incremento del pH de un aislados de 7 a 9 produce modificaciones de la conformación del polipéptido A. Si se incrementa a 10 además se observa un incremento de los polipéptidos A y B, que pueden corresponder a la subunidad de la glicina en la que la unión de los polipéptidos A y B es no covalente.

COMPONENTES DE UN AISLADO Y SUS INTERACCIONES

Las electroforesis ácidas permiten una buena separación de la subunidad intermedia AB y de los polipéptidos A y B, mejor que la lograda en geles de SDS-PAGE, ya que pone de manifiesto su heterogeneidad lo que permitiría utilizar este tipo de electroforesis para caracterizar distintas variedades de harina de soja. Las subunidades α y α' presentan en estas condiciones igual relación carga/masa.

El empleo de electroforesis alcalinas permite observar una gran similitud en el comportamiento de las subunidades β y B. La primera presenta a pH entre 8.5-10.5 una relación carga/masa muy baja, por lo que su movilidad electroforética es inferior a la de las subunidades α' y α , existiendo la posibilidad de que se encuentre asociada. El polipéptido B muestra una gran tendencia a asociarse aún a pH entre 8.5-10.5 y en presencia de urea 8M. Luego de su reducción por la acción del β -mercaptoetanol, forma agregados de alto peso molecular incapaces de penetrar al gel. En medio alcalino las subunidades α y α' también presentan la misma relación carga/masa. La subunidad AB presenta una amplia variación en la relación carga/masa en la misma zona donde bandean α y α' estando los componentes de AB, que poseen una movilidad electroforética menor que α y α' , en mayor proporción que los de mayor movilidad. Este comportamiento pone de manifiesto su heterogeneidad. También se observó la heterogeneidad del polipéptido A luego de la reducción, aunque la resolución lograda en medio alcalino es mucho menor que la lograda medio ácido.

Sección 2

TRATAMIENTOS REDUCTORES

Las uniones disulfuro juegan un rol importante en el mantenimiento de la estructura de las proteínas determinando algunas de las propiedades fisicoquímicas. Su reducción puede mejorar sus propiedades funcionales produciendo según la especie proteica un aumento de solubilidad, que afecta propiedades como gelificación, espumado y emulsificación; produce también un aumento de la flexibilidad molecular, lo que mejoraría las propiedades de superficie (emulsificación y espumado) afectando tanto la capacidad de formación como la estabilidad (Kella y col, 1986; Kim y Kinsella, 1987; Kella y col, 1989 y Klemaszewski y Kinsella, 1990 y 1991). Habitualmente se utilizan distintos agentes para reducir este tipo de uniones, entre los que se pueden mencionar el sulfito de sodio, la cisteína, el ditioneol y el β -mercaptoetanol. La reducción con sulfito de sodio tiene un potencial oxido/reducción que es inferior al de otros reductores como cisteína (-0.22V), β -mercaptoetanol y ditioneol (-0.33V), pero tiene como ventaja que uno de los grupos reducidos queda bloqueado como grupo sulfonato ($R-S-SO_3^{-1}$), lo que impide su posterior reoxidación y por lo tanto reformación de la unión disulfuro, además el aumento en la carga neta de la proteína puede darle mejores propiedades funcionales.

Nuestro propósito fue estudiar las modificaciones que sufren aislados de proteínas de soja cuando son sometidos a tratamientos reductores con sulfito de sodio en distintas condiciones. En primer lugar se analizó el efecto de la concentración del agente reductor. Las modificaciones se evaluaron a través de cambios en los perfiles electroforéticos. En la **Figura 18** se muestran los resultados obtenidos, al realizar tratamientos a una concentración de proteína de 100 mg/ml y concentraciones de Na_2SO_3 entre 0.01-1.0% p/v, a 25°C. Si se comparan estos perfiles con el obtenido para un aislado control se observa que la reducción produce la desaparición de los agregados 1 y 2, con un incremento concomitante de las fracciones α' y α , una gradual disminución de la subunidad intermedia AB-11S y un pequeño incremento de los polipéptidos A y B-11S. Aún para las concentraciones de reductor más altas no se logra una reducción completa de AB-11S. Esto se puede deber a dos motivos: desplazamiento incompleto de la reacción de reducción, a pesar del gran exceso de uno de los reactivos ya que los grupos R-SH producidos se están acumulando en el medio de reacción y a la falta de acceso del agente reductor a las uniones disulfuro que unen los polipéptidos A y B (**Figura 18**). Es importante aclarar que a pesar de que las modificaciones se están estudiando por cambios en los perfiles electroforéticos SDS-PAGE, la presencia de SDS no mejora el acceso del reductor a las uniones disulfuro entre los dímeros AB-11S. El

TRATAMIENTOS REDUCTORES

SDS interactúa con las proteínas produciendo complejos SDS-proteína, que conservan gran parte de la estructura secundaria y terciaria de la misma (Brassard y col 1991). La reacción de reducción en presencia de un exceso de reductor se siguió a través de electroforesis, porque el Na_2SO_3 interfiere en el dosaje de grupos sulfhidrilos libres (SH_L) con DTNB (Humphrey y col 1970) y como precaución, las muestras que se sembraron en las electroforesis, no se hirvieron como es habitual, pues dicho tratamiento modifica el grado de reducción alcanzado ya que produce desnaturalización y oxidación de grupos SH_L .

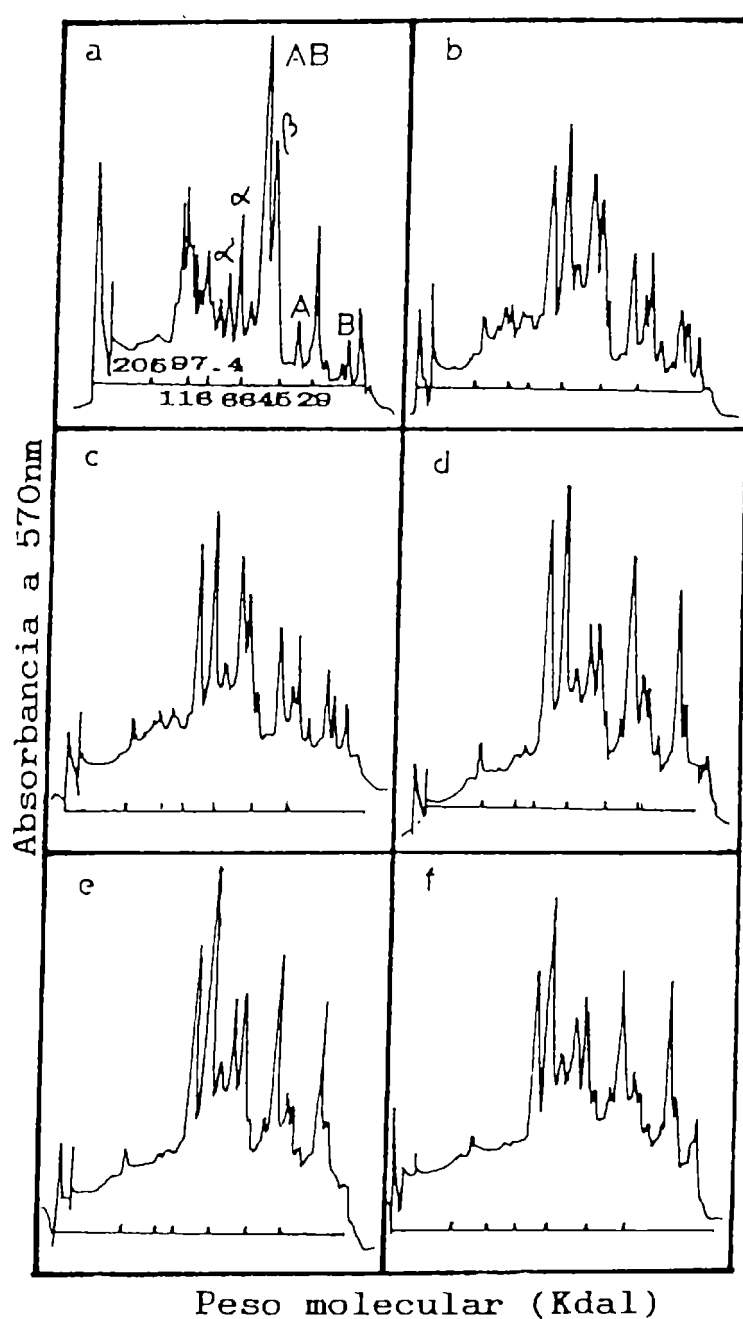


Figura 18: Densitogramas SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%, correspondientes a aislados de proteína de soja 100 mg/ml tratados a pH 8 con 0% (a); 0.01% (b); 0.05% (c); 0.25% (d); 0.50% (e) y 1.0% (f) p/v de Na_2SO_3 .

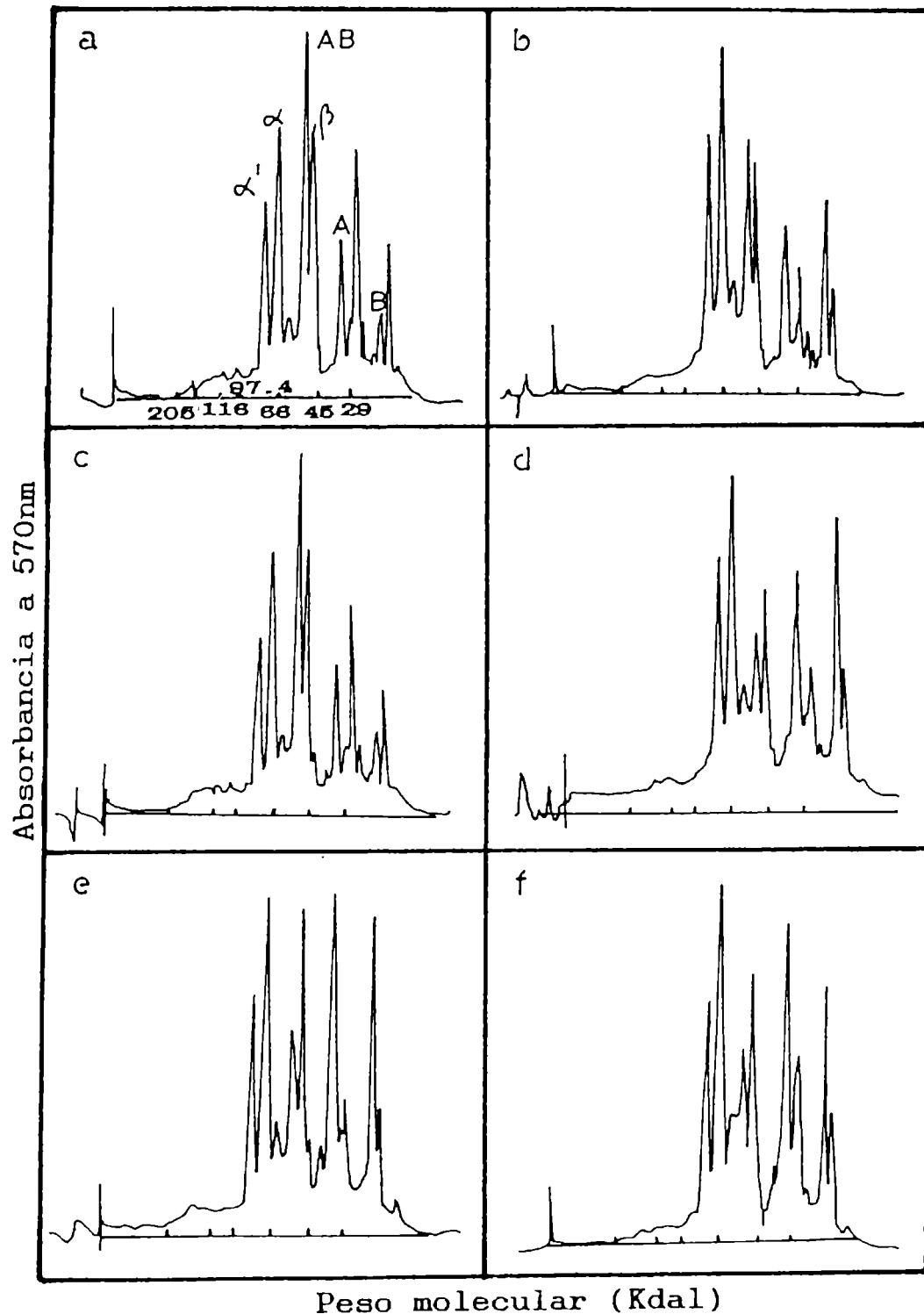


Figura 19: Densitogramas SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%, correspondientes a aislados de proteína de soja reducidos con Na_2SO_3 a distintas concentraciones de proteína. Na_2SO_3 0.1% p/v (a, c y e) y 1.0% p/v (b, d y f). Proteína 10% (a y b); 5% (c y d) y 1% p/v (e y f).

Posteriormente se analizó el efecto de modificaciones en la concentración de proteína y variaciones en la relación reductor/proteína en dicha reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 19**. Para las concentraciones de proteína 50 y 100 mg/ml, un incremento de la concentración de Na_2SO_3 de 0.1 a 1.0% p/v (**Figura 19 c-a y d-b**,

TRATAMIENTOS REDUCTORES

respectivamente), produce un aumento en el grado de reducción de la subunidad intermedia AB-11S; en tanto que para la concentración de proteína de 10 mg/ml igual incremento de la concentración de Na_2SO_3 no mejora la reducción. Este último hecho indicaría que para la menor concentración de proteína utilizada, una concentración de Na_2SO_3 0.1 % es saturante. Se observa además que en estas condiciones la altura de pico de la subunidad AB-11S se hace inferior a la altura de la subunidad β -7S; esta inversión en la relación de alturas de pico AB-11S/ β -7S también se observa para una concentración proteica de 50 mg/ml y Na_2SO_3 1.0%. La relación concentración de proteína/concentración Na_2SO_3 10 mg/ml: 0.1 % ó 50 mg/ml: 1 % producen el mismo grado de reducción, no lográndose una reducción completa aún con un gran exceso de reductor, aunque el mismo sí mejora el acceso a las uniones disulfuro que unen los polipéptidos A y B-11S.

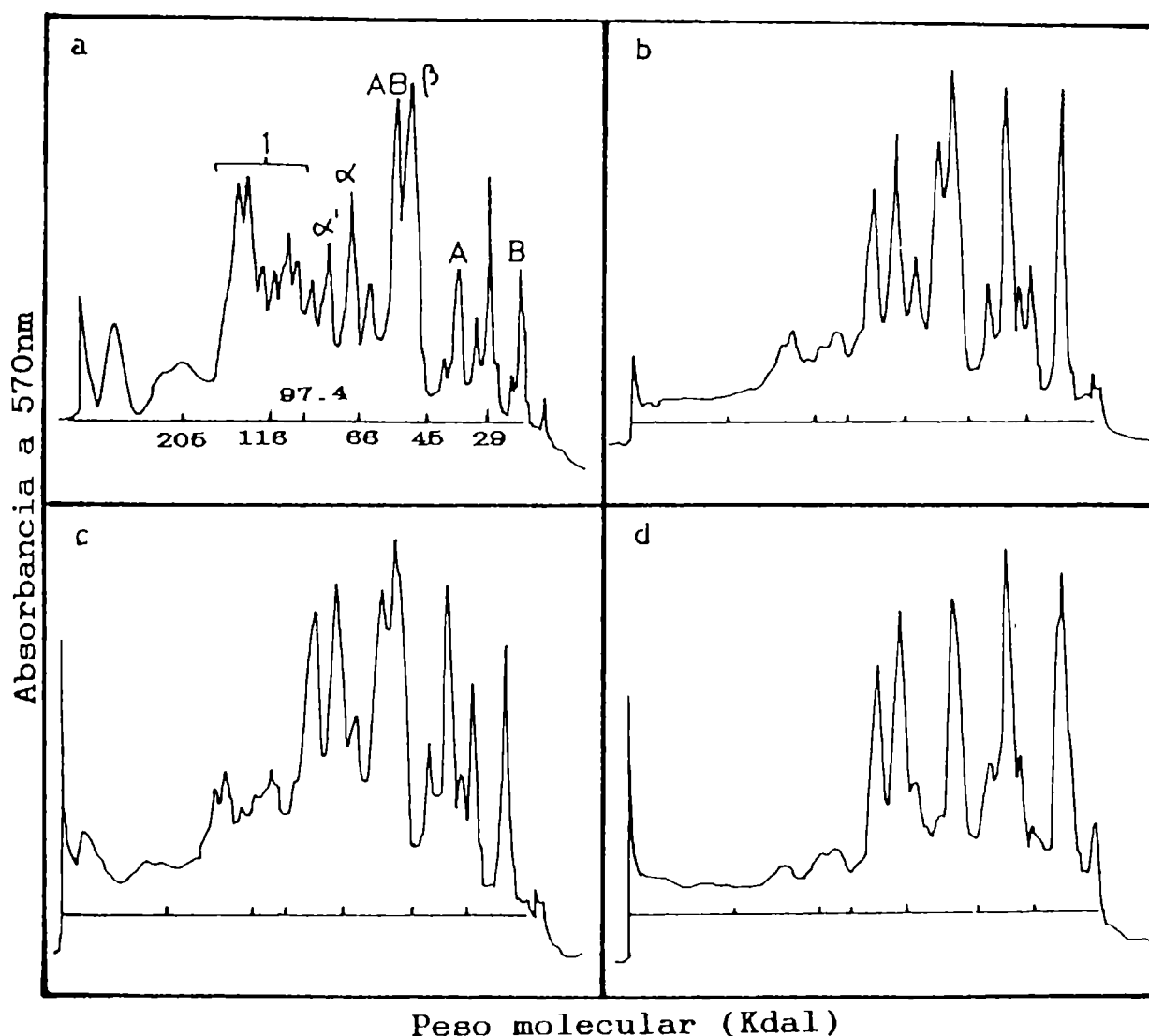


Figura 20: Densitogramas SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados de proteínas de soja tratados a una concentración de proteína 8% p/v pH 8 con Na_2SO_3 0.1 % p/v a 20°C (b); 50°C (c) y 100°C (d). Control sin sulfito (a).

También se estudio el efecto del incremento de la temperatura sobre el desplazamiento de la reacción de reducción (**Figura 20**). Se observa que un incremento de la temperatura de reacción de 20 a 50°C no tiene efecto en el grado de reducción y que tratamientos a 100°C mejoran la misma. Para concentraciones de Na_2SO_3 0.01 % el calentamiento a 100°C produce un ligero aumento en el nivel de reducción; mientras que para concentraciones más altas el efecto logrado es mayor. La **Figura 20** ejemplifica dicho efecto. En ella puede observarse que la altura de pico de los polipéptidos A y B se hace superior al de la subunidad β -7S. El tratamiento térmico a estas temperaturas puede favorecer la reacción de dos maneras: en primer lugar produciría desnaturalización de las globulinas 7S y 11S, lo que mejoraría el acceso del agente reductor a las uniones disulfuro que se encontraban ocultas en la estructura proteica y en segundo lugar actuaría oxidando los grupos R-SH producidos en la reacción lo que mejoría el desplazamiento de izquierda a derecha. La adición de agentes desnaturalizantes (como urea 8M) que abren la estructura de la proteína produciendo una exposición de las uniones disulfuro, favorece la reacción de reducción (**Figura 21**). En presencia de urea se produce una completa reducción de la subunidad intermedia AB-11S, junto con un incremento de los polipéptidos A y B.

En la **Figura 22** se muestra el efecto de la concentración de Na_2SO_3 (0.05-10 % p/v) sobre la estabilidad térmica de las globulinas 7S y 11S. Al incrementar la concentración de reductor se observa un corrimiento de la temperatura de desnaturalización hacia valores más altos para ambas globulinas (por ejemplo una concentración de Na_2SO_3 10 %, incrementa la temperatura de desnaturalización en aproximadamente 20°C) además de una leve disminución de la entalpía de desnaturalización de la glicinina (ΔH : 7.69 ± 0.84 y 9.40 ± 0.58 J/g para las muestras tratadas con Na_2SO_3 10 % y 0.05 %, respectivamente). Por lo tanto deben controlarse los pares temperatura/concentración de sulfito empleados para mejorar la reducción, ya que aunque es necesario una elevada concentración Na_2SO_3 para lograr un buen desplazamiento de la reacción de reducción hacia la izquierda, el incremento de la temperatura de desnaturalización puede hacer al tratamiento térmico insuficiente para desnaturalizar la proteína exponiendo sus uniones disulfuro.

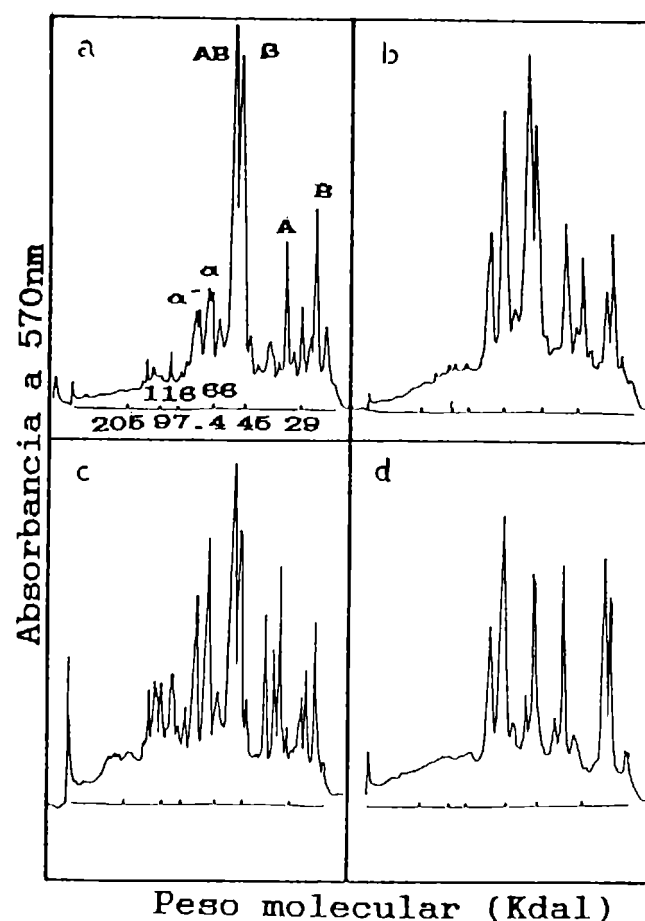


Figura 21: Densitogramas SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados de proteína de soja tratados con Na_2SO_3 en presencia de urea. Sin urea (a y b). Urea 8M (c y d). Sin Na_2SO_3 (a y c). Na_2SO_3 1.0% p/v (b y d).

En la **Tabla 8** se muestran los valores de grupos sulfhidrilos libres bajo diferentes condiciones de reacción. El aislado reducido en presencia de urea 8M, presenta un valor de grupos SH_L ($4.965 \pm 0.095 \mu\text{mol/g}$ proteína) menor que el correspondiente a la reducción completa de la proteína 11S. Probablemente se deba a que los grupos SH_L son inestables por lo que se producen reacciones de oxidación luego de eliminado el agente reductor del medio de reacción. También se observa que el tratamiento a 100°C provoca un aumento significativo del número de grupos SH_L .

Los resultados anteriores muestran que la reducción, en distintas condiciones, de aislados de proteínas de soja con Na_2SO_3 afecta fundamentalmente a los agregados de peso molecular 100-200 Kdal, que se vuelven a formar luego de removido el agente reductor, y a componentes de bajo peso molecular como los polipéptidos A y B. Pero la reducción de la

subunidad intermedia AB-11S es muy limitada.

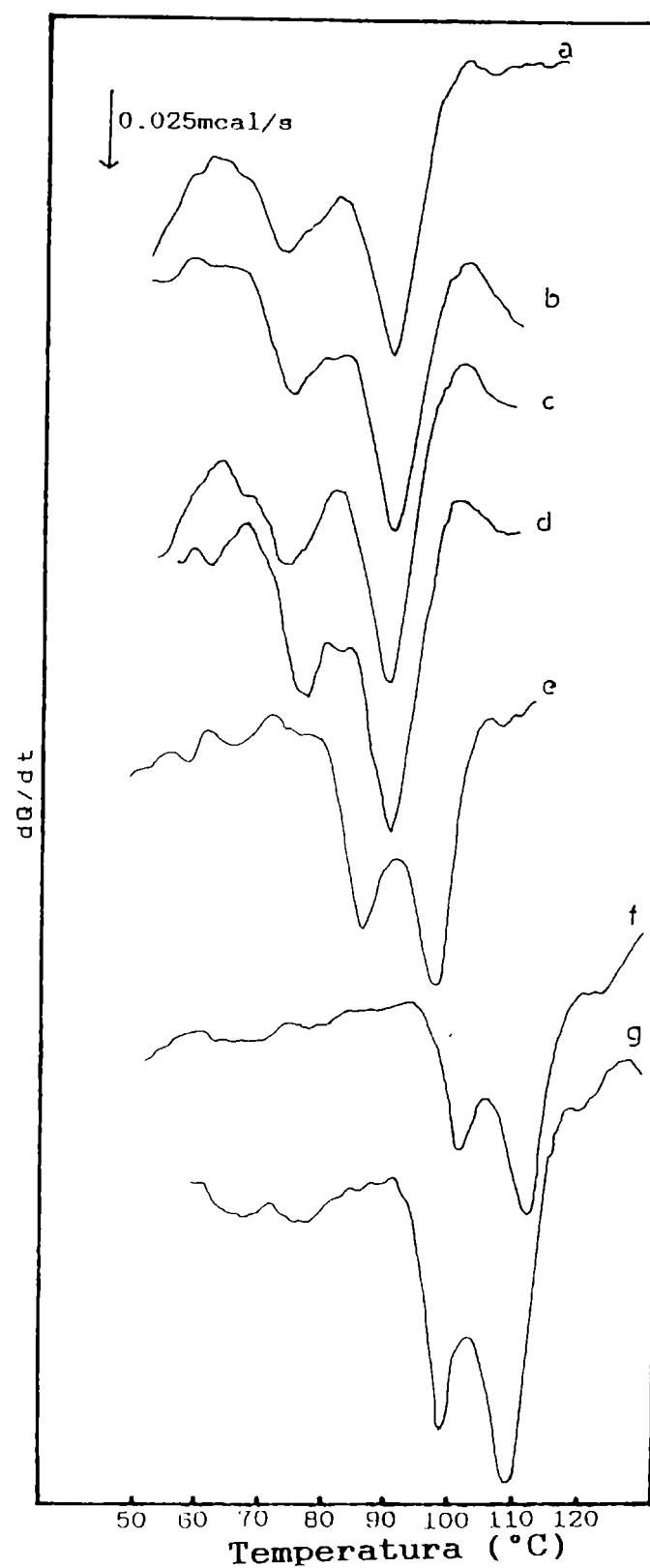
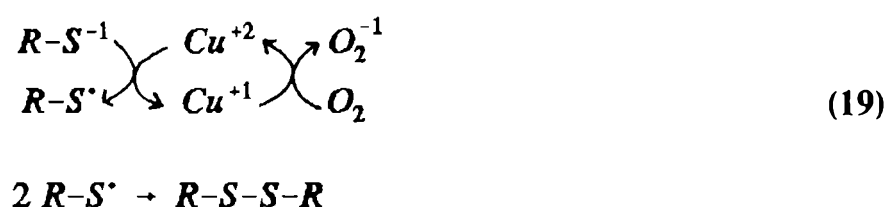
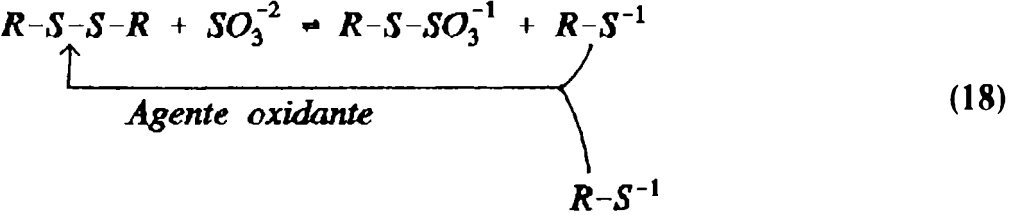


Figura 22: Termogramas de aislados de proteína de soja tratados con Na_2SO_3 0% (a); 0.05% (b); 0.20% (c); 0.50% (d); 2.0% (e); 5% (f) y 10% p/v (g).

Muestra	sin urea	urea 8M
sin Na ₂ SO ₃	1.475±0.095	1.335±0.055
Na ₂ SO ₃ 1.26 %	3.305±0.075	4.965±0.095

Muestra	no calentada	50°C 60 min	100°C 90 min
sin Na ₂ SO ₃	1.535±0.025	1.270±0.010	0.043±0.013
Na ₂ SO ₃ 0.1 %	4.540±0.030	3.565±0.215	7.055±0.275



1985).

La **Figura 23** muestra el efecto del agregado de CuSO_4 amoniacal en la reducción con Na_2SO_3 0.10M (1.26% p/v) a 42°C , de una solución de aislado (8 mg/ml) en buffer fosfato 0.1M pH 7. La determinación se realizó a 120 oscilaciones por minuto. Los valores iniciales de SH_T y SH_L de la muestra eran de 33.75 ± 0.45 y $1.51 \pm 0.30 \mu\text{moles/g}$. En ausencia de Cu se observa una disminución gradual del número total de sulfhidrilos hasta alcanzar, a los 240 minutos, valores del mismo orden que los logrados cuando se utiliza CuSO_4 1.33mM o 4.00mM ($\text{SH}_T \approx 7.85 \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$). El efecto del Cu es muy rápido, a los 15 minutos de reacción se han reducido más de un 50% de las uniones -S-S- presentes. Posteriormente se observa una disminución más gradual del contenido de sulfhidrilos totales alcanzando valores de reducción mayores al 75%. Se observa además, que no existe una diferencia apreciable en el proceso de reducción con las concentraciones de cobre. Esto sugiere que las cantidades de cobre empleadas resultan saturantes.

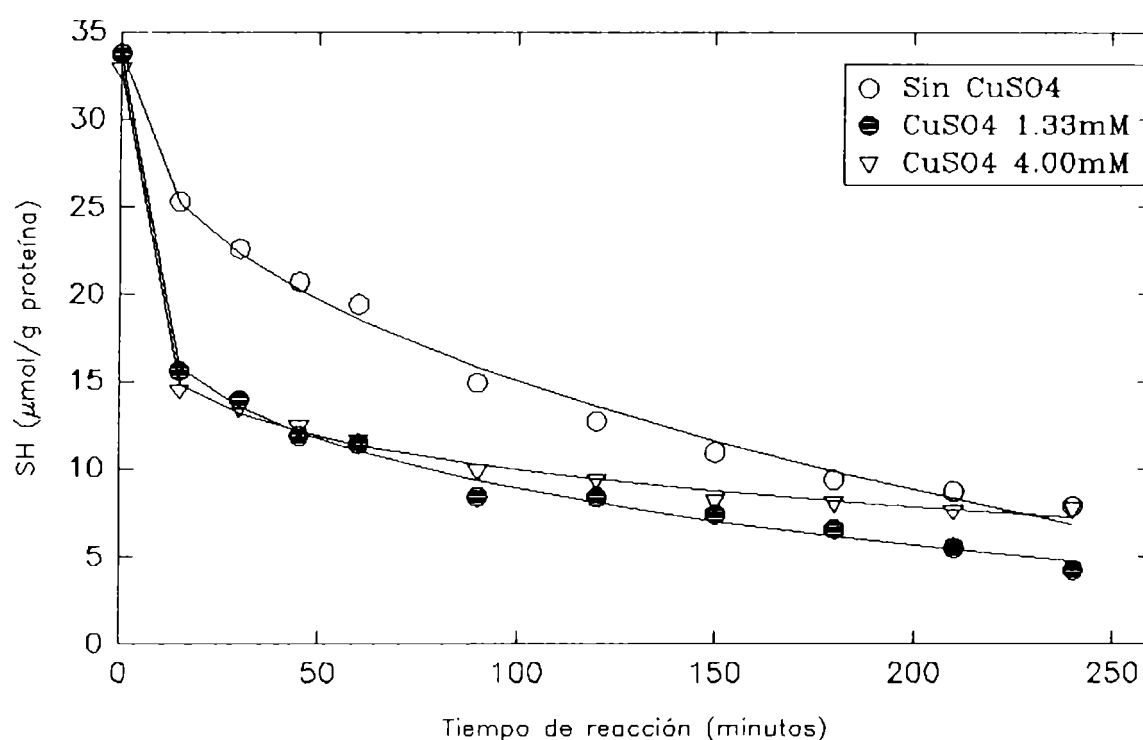
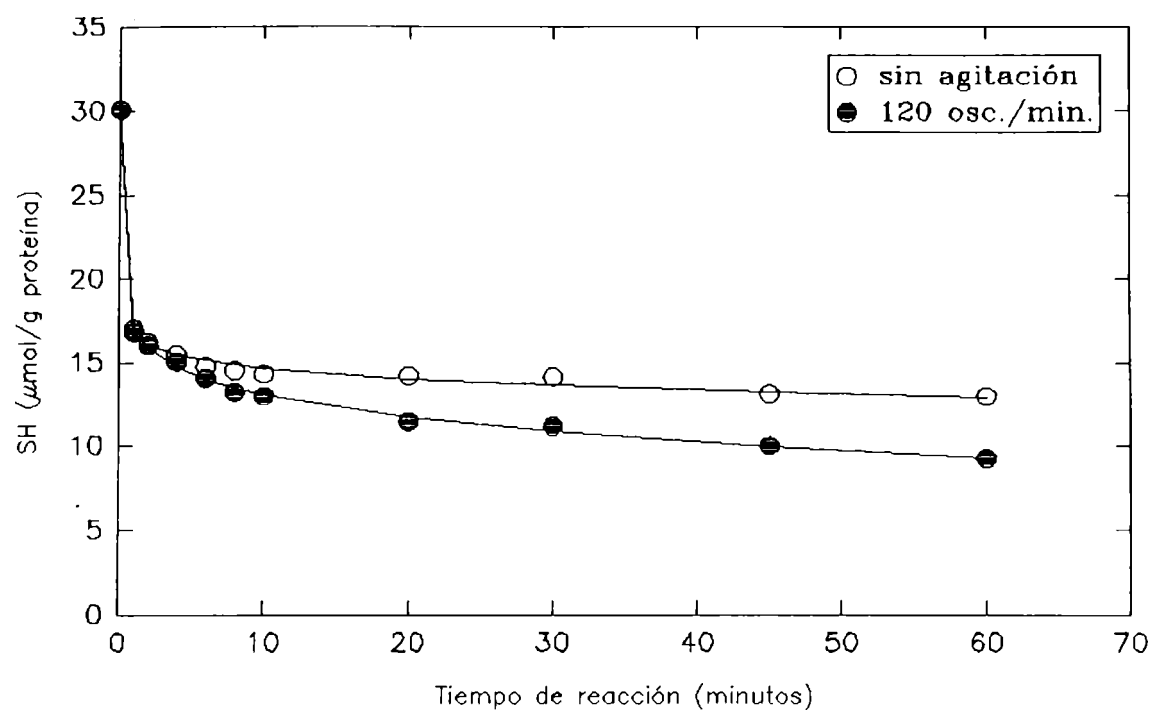


Figura 23: Efecto del agregado de CuSO_4 amoniacal en la reducción de aislados de proteína de soja (8 mg/ml) tratados a 42°C durante diferentes tiempos con Na_2SO_3 0.1M y con una agitación de 120 osc/min. Las concentraciones de CuSO_4 amoniacal empleadas fueron 0, 1.33 y 4.00mM.

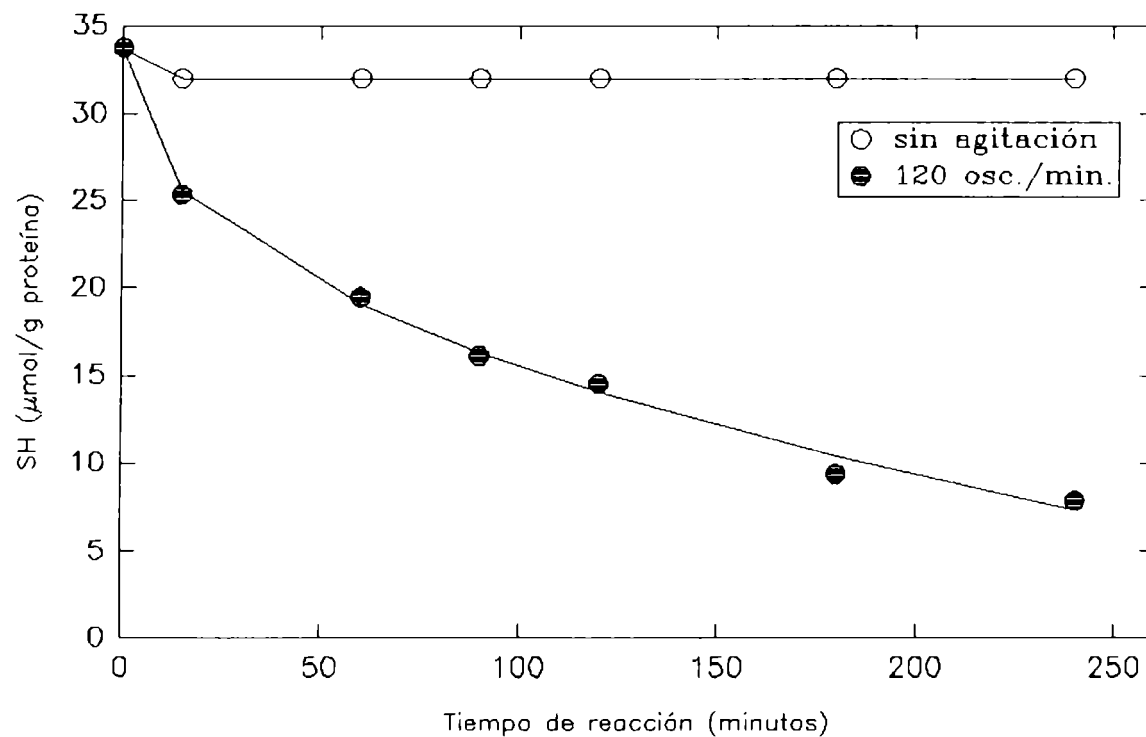
La **Figura 24** muestra el efecto de la agitación en el proceso de reducción. La agitación produce una disminución gradual de SH totales llegándose a valores del mismo orden que los alcanzados en presencia de cobre. Esta disminución gradual se relaciona con la velocidad de incorporación de oxígeno con la agitación. Al minuto de reacción, en presencia de 1.33mM de Cu, puede observarse que el valor de SH_T disminuyó hasta $15.00 \pm 0.25 \mu\text{moles/g}$, a tiempos mayores la velocidad decrece lográndose a los 60 minutos valores de 9.00 ± 0.16 y $12.00 \pm 0.88 \mu\text{moles/g}$ de proteína, para los aislados agitados y no agitados respectivamente. En ausencia de cobre y con agitación, luego de 3 horas de reacción se logra una reducción de uniones disulfuro del orden del 75 %; mientras que cuando el cobre está presente se llega a este valor al cabo de una hora, tanto si la reacción se realiza o no con agitación.

La **Figura 25** muestra el efecto de la temperatura en la reducción a dos concentraciones de Na_2SO_3 , en ausencia de cobre y sin agitación. La reducción, a una concentración de Na_2SO_3 1.0 % p/v y luego de 3 horas de tratamiento, es prácticamente independiente de la temperatura. A tiempos mayores es algo más rápida a 42°C , mientras que a concentraciones de Na_2SO_3 100 veces menor la reducción es más rápida a 25°C . El aumento de temperatura puede actuar favoreciendo tanto la reacción de reducción, como la posterior reoxidación y además modificar la cantidad de oxígeno disuelto en el medio. Dado que el Cu y el O_2 muestran una acción equivalente y que el burbujeo de O_2 no es necesario si existe Cu presente, se puede considerar que con 0.01 % p/v Na_2SO_3 , la reacción de oxidación podría ser la etapa limitante de la sulfitólisis, mientras que con 1.0 % p/v Na_2SO_3 en la primera parte del tratamiento (las primeras 3 horas) la etapa limitante sería la incorporación de oxígeno a la mezcla de reacción y en la última parte se haría limitante la etapa de oxidación de los grupos SH_I gradualmente formados.

Para menores concentraciones de Na_2SO_3 (0.01 % p/v) la reducción que se logra es muy baja (12 % a 25°C y 6 % a 42°C); probablemente se debe al hecho que esta concentración es la necesaria estequiométricamente para reducir todas las uniones disulfuro presentes en el aislado. Por lo tanto el equilibrio de la reacción de reducción está poco desplazado y explicaría el porque la reacción es más rápida a menor temperatura.



24.1



24.2

Figura 24: Efecto de la agitación en la reducción de aislados de proteína de soja (8 mg/ml) tratados con Na_2SO_3 0.1M tanto en presencia de CuSO_4 amoniacal 1.33mM (24.1) como en su ausencia (24.2) a 42°C durante diferentes períodos de tiempo.

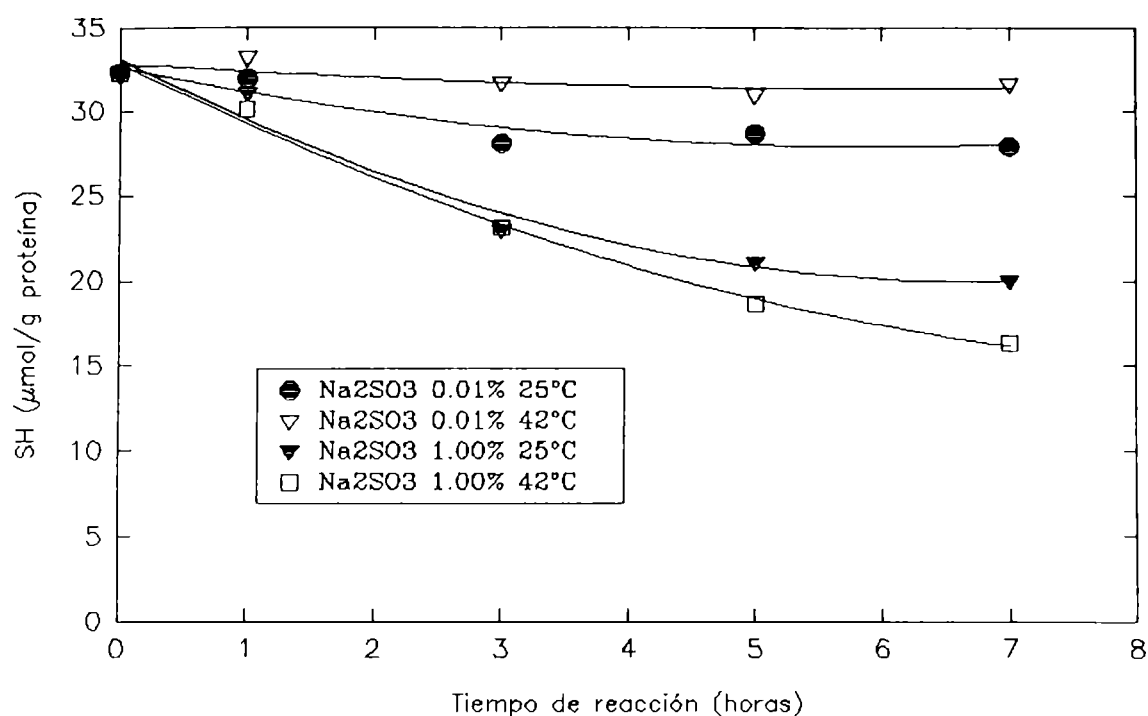
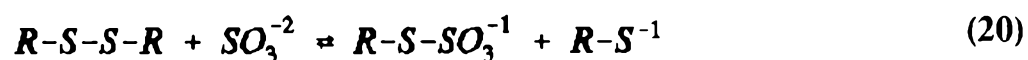
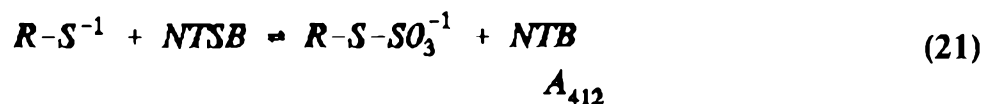


Figura 25: Efecto de la temperatura y de la concentración de Na_2SO_3 en la reducción de aislados de proteína de soja (8 mg/ml) tratados en ausencia de CuSO_4 y de agitación. Las concentraciones de Na_2SO_3 empleadas fueron 0.01 % y 1.00 % p/v, realizándose la reacción a dos temperaturas 25°C y 42°C.

La reducción lograda cuando se utilizan concentraciones de Na_2SO_3 del orden del 1 % p/v, si se emplea cobre o si se incorpora oxígeno por agitación, es aproximadamente del 77 % y del orden del 40 % en su ausencia. El uso de concentraciones tan altas de agente reductor obligan a una eliminación posterior del mismo ya que por su toxicidad no debe quedar sulfito residual. Además su presencia podría afectar de forma adversa la funcionalidad del aislado proteico. Si la concentración es del orden del 0.01 % p/v, en el transcurso de la reacción se consume completamente lográndose sólo un 10 % de reducción.

Cabe aclarar que con el NTSB se dosan sulfhidrilos totales que resultan, en primer lugar de la reducción con el Na_2SO_3 de las uniones disulfuro presente en las proteínas, originándose un grupo sulfhidrilo libre y un grupo sulfonato por cada unión rota y, en segundo lugar, de los sulfhidrilos libres presentes; de acuerdo con las reacciones:





Durante la sulfitólisis se originan también sulfhidrilos libres por acción del sulfito presente en la mezcla de reacción por lo que el número de uniones disulfuro remanentes en el aislado lo deberíamos determinar por diferencia entre el valor de SH_T determinado con NTSB y el valor de SH_L . Sin embargo no es posible dosar SH_L ya que el DTNB reacciona con el sulfito de la mezcla de reacción (Humphrey y col 1970). Algunos autores determinan el valor de SH_L usando el reactivo NTSB preparado sin tiocianato de guanidinio pero lo que dosan en realidad son uniones disulfuro expuestas. Debido a que la agitación o la presencia de cobre, producen oxidación de los grupos SH_L que se van formando, se puede asumir que el número de SH_L es constante, por lo que estamos determinando el número de uniones disulfuro remanentes. En los casos en los que no se empleó Cu o O_2 se podría llegar a dosar dichas uniones en exceso. Para que el número de uniones disulfuro decrezca en función del tiempo es necesario que se formen grupos sulfonatos, por lo que en realidad estamos dosando número de uniones disulfuro remanentes o grupos sulfonatos incorporados.

Se realizaron electroforesis de las muestras tratadas con Na_2SO_3 0.1M a 42°C y 25°C en presencia de cobre 1.33mM y 4.00mM con o sin agitación. Los diagramas obtenidos muestran tres tipos de perfiles (**Figura 26**):

1. Aislado sin tratamiento reductor: presenta, tal como se indicara previamente, además de las fracciones correspondientes a α' , α , β -7S y AB-11S, agregados de peso molecular entre 100-200 Kdal.

2. Aislado tratado con sulfito en ausencia de cobre: se observa una disminución de los agregados de peso molecular 100-200 Kdal con un concomitante aumento las subunidades α y α' -7S (la altura de pico de α y α' se hacen superiores a la altura de pico de la subunidad β -7S), una pequeña disminución de la subunidad intermedia AB-11S y un incremento pequeño del polipéptido A-11S.

3. Aislado tratado con sulfito y cobre: se observa una desaparición de los agregados de PM 100-200 Kdal y un incremento de los polipéptidos A y B-11S.

No se observan cambios en el perfil proteico por el incremento de la concentración de cobre, ni por el incremento de los tiempos de reacción de 1-60 minutos, ni cambios con la agitación en presencia de cobre.

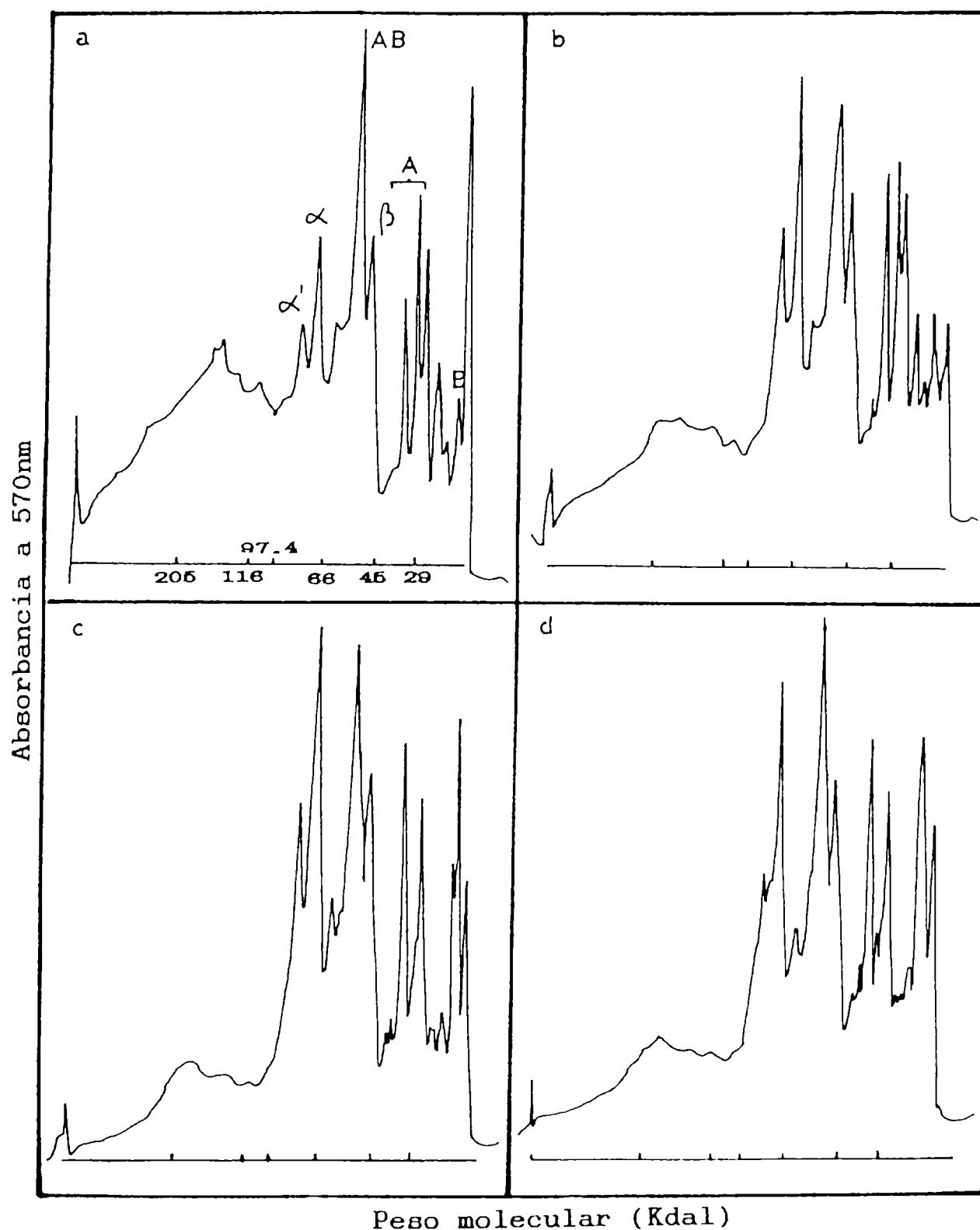


Figura 26: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados proteicos de soja (8 mg/ml) tratados a 42°C con Na_2SO_3 en distintas condiciones: **a:** aislado sin tratamiento reductor. **b:** aislado tratado con Na_2SO_3 en ausencia de cobre. **c:** aislado tratado con Na_2SO_3 0.1M y CuSO_4 1.33mM a tiempo cero. **d:** aislado tratado con Na_2SO_3 0.1M y CuSO_4 1.33mM durante 60 min.

Los aislados tratados con sulfito muestran una disminución de la relación de altura de pico de la subunidad intermedia AB-11S en relación a la subunidad β -7S (AB/ β : 1.30) cuando se lo compara con la correspondiente aislados sin tratamiento (AB/ β : 1.65). A pesar de que se están reduciendo el 70% de las uniones disulfuros presentes en el aislado, la proporción de la subunidad AB-11S sólo se reduce en un 20%. El resto de las uniones disulfuro reducidas corresponden a subunidades de peso molecular inferior a 35 Kdal produciéndose ruptura de uniones intra o intercatenarias. La ruptura de este primer tipo de unión da lugar a una molécula con menor movilidad electroforética ya sea porque la estructura se despliega al perder dicha unión, lo que produce un aumento en su radio de Stockes, o bien a un mejor pegado del SDS cuya interacción con la proteína se hallaba dificultada por las uniones disulfuros.

Los valores de reducción obtenidos en estas condiciones son equivalentes a los que se logran con tratamientos prolongados (15 horas) de Na_2SO_3 . En presencia de urea 6M se obtienen valores de SH_T de 15 $\mu\text{mol/g}$ ($\approx 50\%$ de reducción) no detectándose en los aislados tratados, la subunidad intermedia AB-11S. Esto indicaría que la subunidad AB-11S no se reduce completamente en presencia de CuSO_4 y/o O_2 por la falta de acceso del sulfito a los puntos de ataque. Resultados similares se observan durante la reducción de proteínas de suero de leche donde es necesario agregar urea 4M para impedir la agregación producida por la exposición de grupos hidrofóbicos como consecuencia de la ruptura de uniones disulfuro (Kella y col 1989). La falta de acceso del sulfito puede deberse a que la estructura no se abre completamente a medida que se van reduciendo las uniones disulfuro o bien que la ruptura de las mismas produce exposición de residuos hidrofóbicos seguida por la agregación de la proteína. La necesidad del empleo de agentes desnaturalizantes para que ocurra reducción de la subunidad intermedia AB-11S coincide con resultados de Kim y col (1986), quienes observaron que al reducir la glicinina en presencia de urea 8M y con dos concentraciones de DTT, a la concentración más baja, ocurre reducción de uniones intercatenarias y con la más alta ambos tipos de uniones. Kella y col (1986) también informaron que la reducción completa de la glicinina con Na_2SO_3 , requiere la presencia de CuSO_4 amoniacal, O_2 y urea 4M, este tratamiento produce una disminución de su hidrofobicidad superficial y de su agregación.

El aislado proteico de soja utilizado tiene aproximadamente 32 μmoles de grupos SH_T por gramo de proteína y está constituido por un 34% de la fracción 11S cuyo peso molecular

es aproximadamente 350 Kdal contiene además entre 18-20 uniones disulfuro, 6 de las cuales forman parte de los dímeros AB-11S, por lo que el 53% de los grupos SH_T presentes en el aislado ($17.5\mu\text{moles/g}$) corresponde a la proteína 11S. El 18% de los grupos SH_T ($5.8\mu\text{moles/g}$) corresponde a las uniones que unen a las subunidades A y B para formar los dímeros AB-11S. En ausencia de agentes desnaturalizantes se reduce el 75% de los grupos SH_T , reduciéndose sólo el 20% de los dímeros AB-11S. En presencia de urea se reduce la totalidad de los grupos SS que unen los polipéptidos A y B de los dímeros AB-11S, pero queda un 50% de los grupos SH_T sin reducir. Es decir que la reducción con Na_2SO_3 afecta a diferentes subunidades de acuerdo a las condiciones en las cuales se realiza pudiéndose reducir fundamentalmente dímeros AB-11S si se emplea urea, y reducir mayoritariamente componentes distintos de AB-11S si se utiliza Cu y/o O_2 . Para producir una completa sulfitólisis del aislado se requieren tanto la presencia de urea como de Cu y/o O_2 .

CONCLUSIONES

El cobre y el oxígeno poseen una acción equivalente en el proceso de reducción de proteínas de soja con Na_2SO_3 , no requiriéndose la presencia de ambos en forma simultánea. Son incapaces además de mejorar el acceso del sulfito para producir una completa reducción de la subunidad AB de la glicinina como ocurre en proteínas más simples.

En este sistema para lograr la sulfitólisis completa con Na_2SO_3 no basta el empleo de un agente desnaturalizante, es necesario favorecer el desplazamiento del equilibrio de la reacción con algún agente oxidante. Es preferible el uso de oxígeno y no el de cobre pues, a pesar de que su acción es más lenta, el cobre queda retenido dentro de la estructura de la proteína y puede ser perjudicial tanto desde el punto de vista funcional como nutricional (Gonzalez y Damodaran, 1990 a y b).

En presencia de Na_2SO_3 0.1M se pueden obtener aislados proteicos de soja con un 75% de sus uniones SS reducidas en 15 horas si no se emplean catalizadores, 3 horas si se incorpora oxígeno por agitación y unos minutos si además se adiciona cobre al sistema. Este aislado a pesar de poseer un alto porcentaje de grupos SS reducidos sólo presenta un 20% de reducción de la subunidad AB-11S. Tratamientos con concentraciones de sulfito de 0.01 % p/v producen solamente un 10% de reducción, mientras que a una concentración 100 veces mayor el porcentaje se eleva al 40% (en tiempos de 7 horas, en ausencia de oxidantes y

desnaturalizantes).

De los resultados mostrados se puede concluir que la reducción de aislados de proteínas de soja con Na_2SO_3 afecta a diferentes subunidades, dependiendo de las condiciones en las que se produce la reducción. Se reducen fundamentalmente los dímeros AB de la glicinina si se la reacción se realiza en presencia de urea mientras que se reducen fundamentalmente componentes distintos de AB-11S si se emplean únicamente Cu y/o oxígeno.

Sección 3

TRATAMIENTOS TERMICOS

El tratamiento térmico es uno de los métodos más frecuentemente utilizados para modificar las propiedades funcionales de las proteínas, tales como gelación, emulsificación, espumado (Kinsella, 1982). El calor induce reacciones de disociación/asociación que dependen de la naturaleza de la especie proteica y de las condiciones de fuerza iónica, pH, tiempo y temperatura de calentamiento, naturaleza de los iones presentes, presencia de compuestos con grupos sulfhidrilos o disulfuros y velocidad de enfriamiento. Estos factores determinan que la proteína se agregue en forma irreversible dando origen a agregados de distinto peso molecular y estructura; o bien recupere su conformación nativa, ya sea en forma parcial o total (Damodaran 1988). El comportamiento térmico de la glicinina (Yamagishi y col 1980, 1981 a y b; 1982 a y 1987; Mori y col 1982 a y b y 1986; Utsumi y Kinsella, 1985 a) y de la β -conglucina (Iwabuchi y col 1991 a y b) ha sido ampliamente estudiado; al igual que el de mezclas equimoleculares de glicinina y β -conglucina (German y col 1982; Damodaran y Kinsella 1982; Yamagishi y col 1983 a y Utsumi y col 1984). Sin embargo el comportamiento térmico de aislados de proteínas de soja se ha estudiado muy poco, al igual que su incidencia en la funcionalidad de los mismos.

En esta sección se analizarán las modificaciones producidas por tratamientos térmicos a distintas temperaturas, tiempos, pH, en presencia o ausencia de reductores, en aislados proteicos de soja con el objeto de determinar las condiciones en las cuales se producen reacciones de disociación/asociación y qué componentes del aislado se encuentran involucrados.

Aislados de proteína de soja (70 mg/ml) fueron sometidos a tratamientos térmicos a diferentes temperaturas (60-100°C) durante períodos de 30 minutos. Las modificaciones producidas se siguieron a través de electroforesis SDS-PAGE, en ausencia de β -mercaptoetanol (**Figura 27**). Los resultados obtenidos muestran que los perfiles electroforéticos de los aislados tratados a temperaturas inferiores a 80°C no muestran diferencias significativas entre sí, siendo equivalentes al obtenido para un aislado nativo. Por lo que bajo estas condiciones de ensayo, no ocurre agregación a pesar de que las proteínas del aislado han sufrido desnaturalización, la cual es total para la globulina 7S y parcial para la 11S. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos por Yamagishi y col (1980) quienes no observaron agregación al tratar una suspensión de glicinina 0.5% p/v a 70°C y fuerza iónica 0.1M. Cuando los tratamientos se realizan a mayor temperatura, 90 y 100°C, las fracciones más afectadas son la subunidad AB-11S, dos proteínas de peso molecular 20 y 29

Kdal y los polipéptidos A y B-11S.

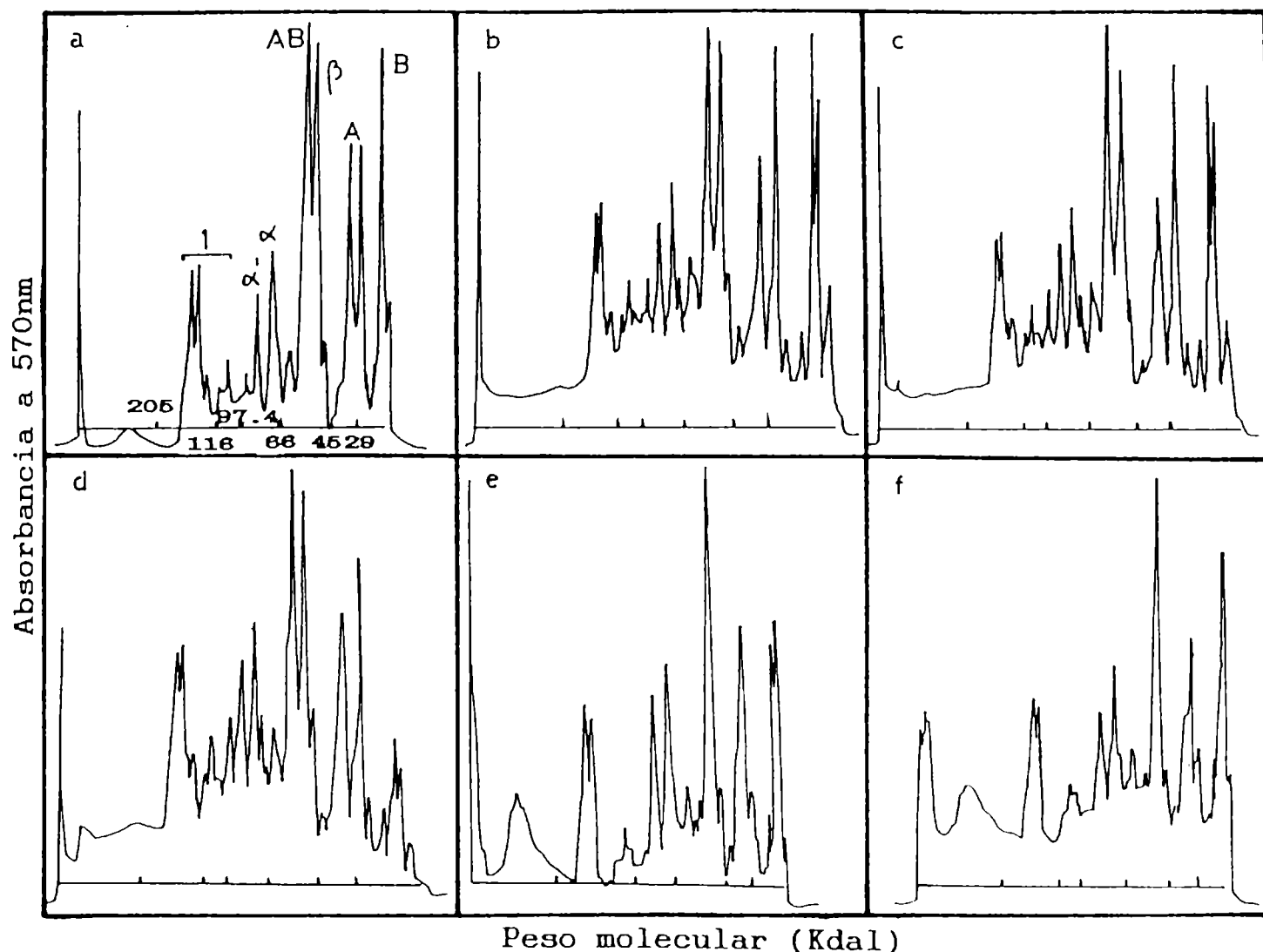
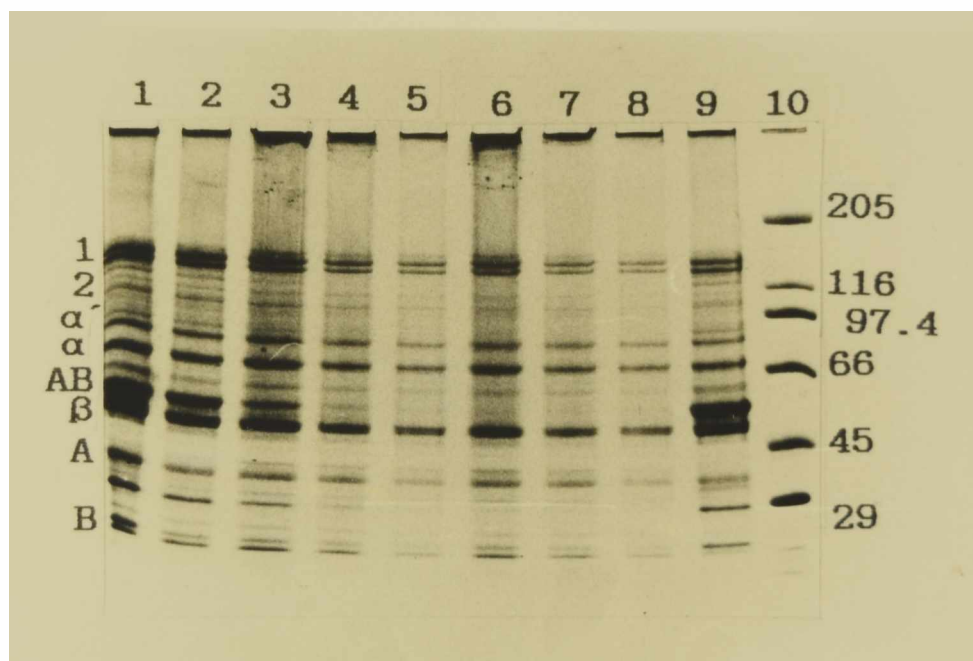


Figura 27: Densitogramas correspondientes a un gel SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de un aislado sin tratamiento térmico (a) y de aislados tratados a 60°C, 70°C, 80°C, 90°C y 100°C durante 30 min (b, c, d, e y f, respectivamente).

La **Figura 28** y la **Fotografía 8** muestran las modificaciones que se producen al tratar aislados de proteínas de soja (70 mg/ml) a 100°C durante distintos tiempos. Luego de un minuto de tratamiento no se observan modificaciones en el perfil proteico, probablemente este hecho se deba a que la temperatura alcanzada a este tiempo es del orden de 86°C. A partir de los 2 minutos se notan las primeras modificaciones, que involucran la disminución del polipéptido de 20 Kdal y el incremento del polipéptido de 19 Kdal. A partir de los 3

TRATAMIENTOS TERMICOS

minutos se detecta un incremento creciente de la agregación de la subunidad intermedia AB-11S y de la proteína de 29 Kdal y un aumento gradual de los polipéptidos A y B-11S. Los cambios más notables se producen entre los 3-6 minutos de tratamiento, estando la temperatura de la mezcla de reacción en este período entre 96 y 98°C. Entre los 7 y 15 minutos de tratamiento las modificaciones son mucho más leves. Si el tratamiento se realiza a 90°C (**Fotografía 9** y **Figura 29**) se observan las mismas modificaciones que a 100°C, pero estas ocurren a tiempos más prolongados y en menor extensión: a los 2 minutos se observa la disminución de la proteína de 20 Kdal, entre los 3-7 minutos ocurre un decrecimiento gradual de la subunidad AB y de la proteína de 29 Kdal y un incremento leve de los polipéptidos A y B.



Fotografía 8: Electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados proteicos de soja tratados a 100°C distintos tiempos a una concentración de proteína de 70mg/ml. Los tiempos de tratamiento fueron 1; 2; 3; 5; 6; 7; 10 y 15 minutos para las calles 1-8, respectivamente. La calle 9 corresponde a un aislado sin tratamiento térmico y la 10 a los patrones de peso molecular.

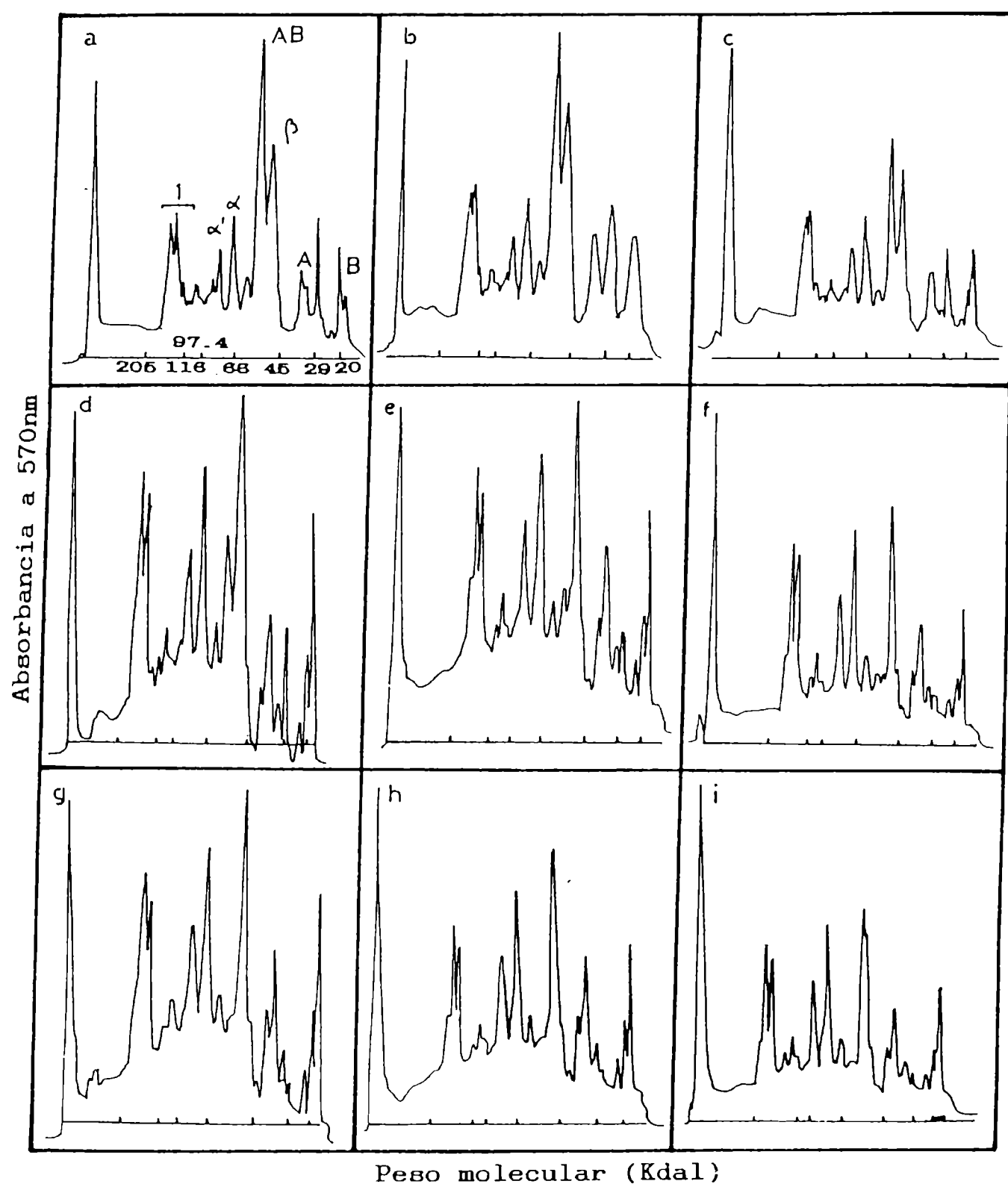


Figura 28: Densitogramas correspondientes a un gel SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados proteicos de soja tratados a 100°C distintos tiempos a una concentración de proteína de 70mg/ml. Los tiempos de tratamiento fueron 0; 1; 2; 3; 5; 6; 7; 10 y 15 minutos para las partes a, b, c, d, e, f, g, h e i, respectivamente.

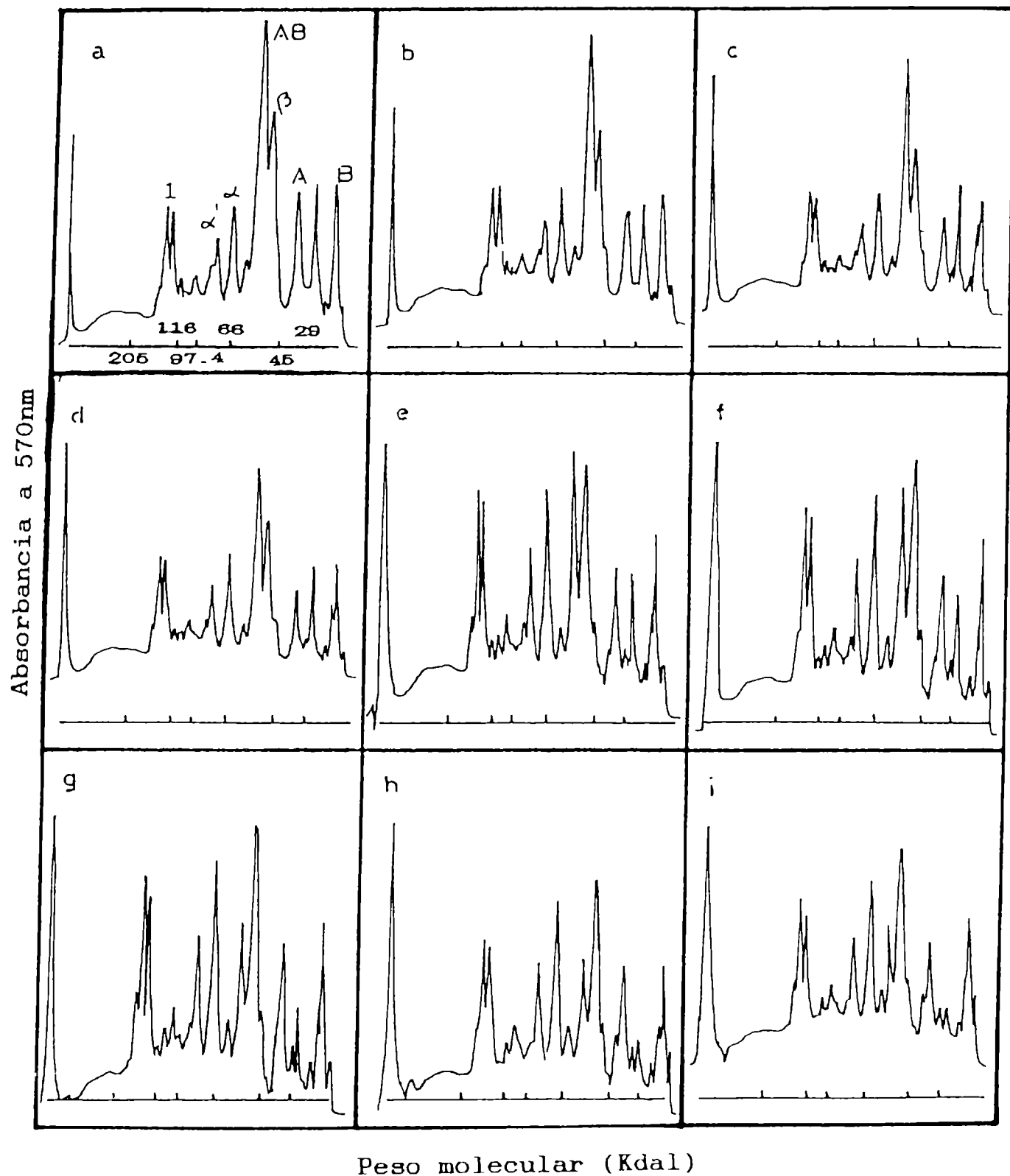
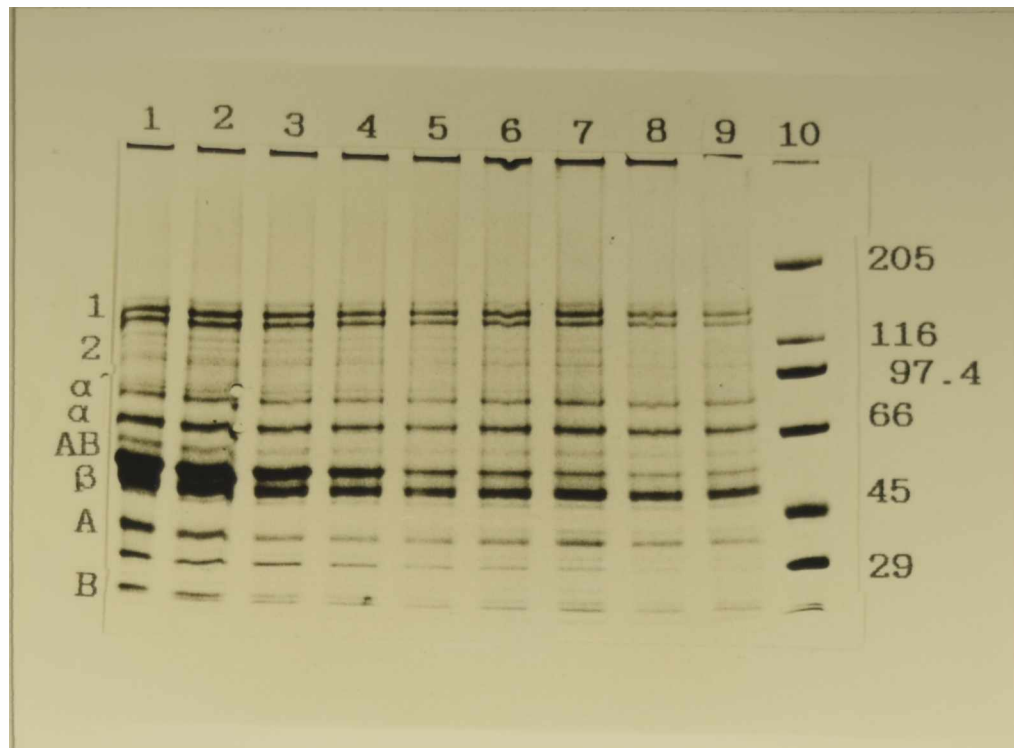


Figura 29: Densitogramas correspondientes a un gel SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados proteicos de soja tratados a 90°C a una concentración proteica 70mg/ml. Los tiempos de tratamiento fueron 0; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10 y 15 min. para las partes a, b, c, d, e, f, g, h e i, respectivamente.

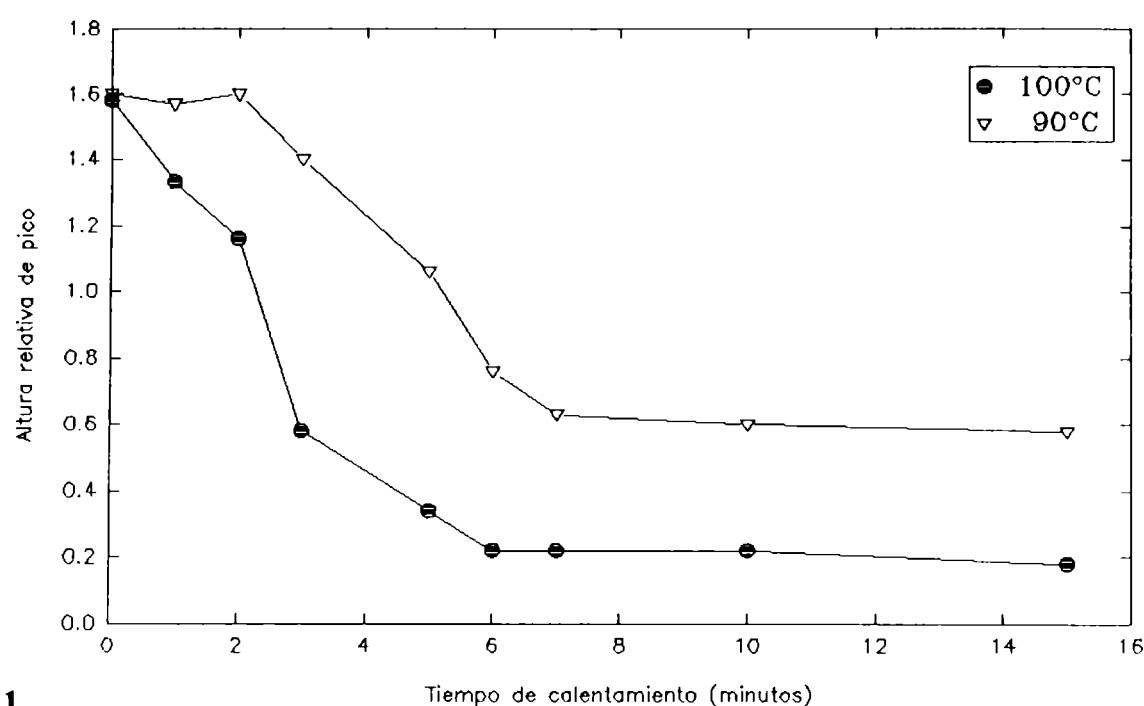


Fotografía 9: Electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados proteicos de soja tratados a 90°C a una concentración proteica 70mg/ml. Los tiempos de tratamiento fueron 0; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10 y 15 min. para las calles 1-9, respectivamente. La calle 10 corresponde a los patrones de peso molecular.

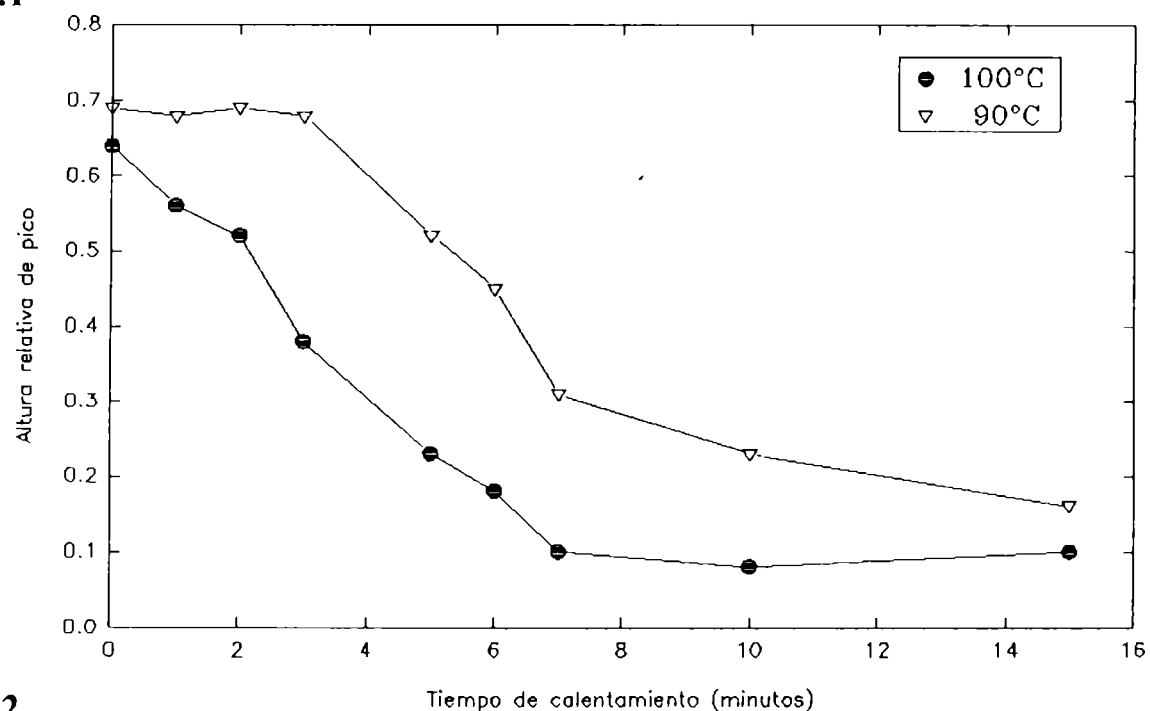
Para cuantizar las modificaciones observadas se tomaron las variaciones de altura de pico de la subunidad intermedia AB-11S en relación a la subunidad β -7S y de la proteína de 29 Kdal en relación a β -7S. De esta manera podemos independizarnos de la cantidad de proteína sembrada en cada gel. Cabe señalar que las alturas relativas de los diferentes picos se tomaron en relación a la subunidad β de la β -conglucina, pues de acuerdo a nuestras observaciones, esta fracción es la menos alterada por los tratamientos térmicos llevados a cabo. La **Figura 30** muestra las variaciones de las alturas de pico relativas de la subunidad intermedia AB-11S y de la proteína de 29 Kdal en función del tiempo de tratamiento a 90 y 100°C. Entre los 3-7 minutos de tratamiento se observa un aumento en la agregación de la subunidad intermedia AB. Posteriormente esta subunidad disminuye gradualmente, siendo los valores residuales luego de 15 minutos de tratamiento a 90 y 100°C del orden de 39 y 13%, respectivamente. En ambos casos los primeros cambios en el estado de agregación se

TRATAMIENTOS TERMICOS

detectan cuando la temperatura supera los 85°C, temperatura correspondiente a la desnaturalización de la glicinina (Damodaran 1988). Las modificaciones observadas en la subunidad de 29 Kdal son paralelas a las de la subunidad AB. Esta proteína podría ser uno de los componentes de la globulina 7S básica, la que se caracteriza por presentar este tipo de comportamiento térmico (Sathe y col 1989).



30.1



30.2

Figura 30: Variación de la altura de pico relativa de la subunidad AB (30.1) y de la proteína de 29 Kdal (30.2) en relación a la altura de la subunidad β en función del tiempo de calentamiento a 100°C y 90°C.

Se analizaron también las modificaciones producidas por tratamientos a 90 y 100°C durante períodos de hasta 90 minutos. Los resultados obtenidos (no mostrados) indican que luego de los 30 minutos la agregación es del orden del 87% independientemente de si el tratamiento fue a 90 o a 100°C. Asimismo se observa un incremento importante del polipéptido B, cuya altura de pico supera a la de la subunidad β -7S. Este aumento va acompañado por un incremento del polipéptido A, aunque el mismo es un 50% menor que el correspondiente al polipéptido B. Este último resultado está de acuerdo con los obtenidos por Yamagishi y col (1983 a) quienes observaron que el tratamiento de glicinina en condiciones de gelación, va acompañado de disociación de los polipéptidos A y B. No obstante, nuestros resultados muestran que en períodos de tiempo cortos de calentamiento a temperaturas superiores a la de desnaturalización de la glicinina, ocurre agregación de la subunidad intermedia AB sin que se detecte disociación. Es necesario alcanzar la temperatura de desnaturalización de la glicinina para que comience a agregarse la subunidad AB y una vez lograda la misma tratamientos térmicos más prolongados producen ruptura de dichos agregados.

No se detectaron modificaciones en las proporciones relativas de los agregados de alto peso molecular 100-200 Kdal, descritos en la primer sección, ni de las subunidades α' y α de la β -conglycinina. La presencia de estos agregados, que están formados por las subunidades α y α' , a esta temperatura (que es superior a la temperatura de desnaturalización de la β -conglycinina) sugiere que los mismos son estables a tratamientos térmicos en estas condiciones o que se vuelven a formar durante el período de enfriamiento. Estos resultados concuerdan con lo observado por Utsumi y col (1984). Sin embargo no coinciden con lo informado por Iwabuchi y col (1991 b) quienes mostraron que las formas de la β -conglycinina constituidas únicamente por α y α' , son las más inestables debido a la alta polaridad que poseen estas subunidades. Cabe aclarar que las modificaciones producidas por el tratamiento térmico en los agregados de tipo 2, observadas en la primer sección, se deben a que las condiciones empleadas en este caso eran más drásticas (tratamiento a 98°C durante 90 minutos a una concentración de proteína de 1 % p/v).

Cabe señalar que de acuerdo los parámetros cinéticos obtenidos para la glicinina, tratamientos a 80°C por 30 minutos producen la desnaturalización del 50% de la misma (Arrese, 1991). En la **Tabla 9** se muestra el efecto de tratamientos térmicos a 80°C sobre las temperaturas y grado de desnaturalización de las globulinas 7S y 11S. Al minuto de

TRATAMIENTOS TERMICOS

tratamientos se observa una completa desnaturalización de la β -conglucina. Aproximadamente un 50% de la glicina permanece nativa luego de 60 minutos de tratamiento a 80°C, detectándose un corrimiento de la temperatura de desnaturalización hacia mayores temperaturas. Este hecho indica que el tratamiento afecta principalmente a la fracción de la globulina 11S más inestable. La falta de agregación observada cuando se realizan tratamientos térmicos prolongados a 80°C estaría indicando la necesidad de una desnaturalización completa de la glicina para que ocurra agregación. Dicha desnaturalización se logra cuando el aislado alcanza la temperatura de 89-90°C. Este comportamiento está de acuerdo con resultados obtenidos por Nakamura y col (1985), quienes observaron que para la formación del progel son necesarios tratamientos térmicos a 100°C durante un minuto.

Tabla 9: Efecto del tiempo de tratamiento térmico a 80°C sobre el grado y temperaturas de desnaturalización de 7S y 11S.

Tiempo (minutos)	T _d 7S (°C)	T _d 11S (°C)
0	78.06±0.30	88.95±0.19
1	-	91.36±0.77
5	-	91.12±0.53
30	-	91.37±0.75
60	-	91.83±0.95

Tiempo (minutos)	ΔH 7S (J/g)	ΔH 11S (J/g)	% 11S nativa
0	5.34±0.035	12.68±0.31	100
1	-	7.58±0.84	59.8
5	-	6.83±0.82	53.9
30	-	6.62±0.23	52.2
60	-	6.52±0.24	51.4

Se determinaron también las temperaturas de desnaturalización de las globulinas 7S y 11S antes y después de la precipitación isoeléctrica, que se realiza en el proceso de obtención de

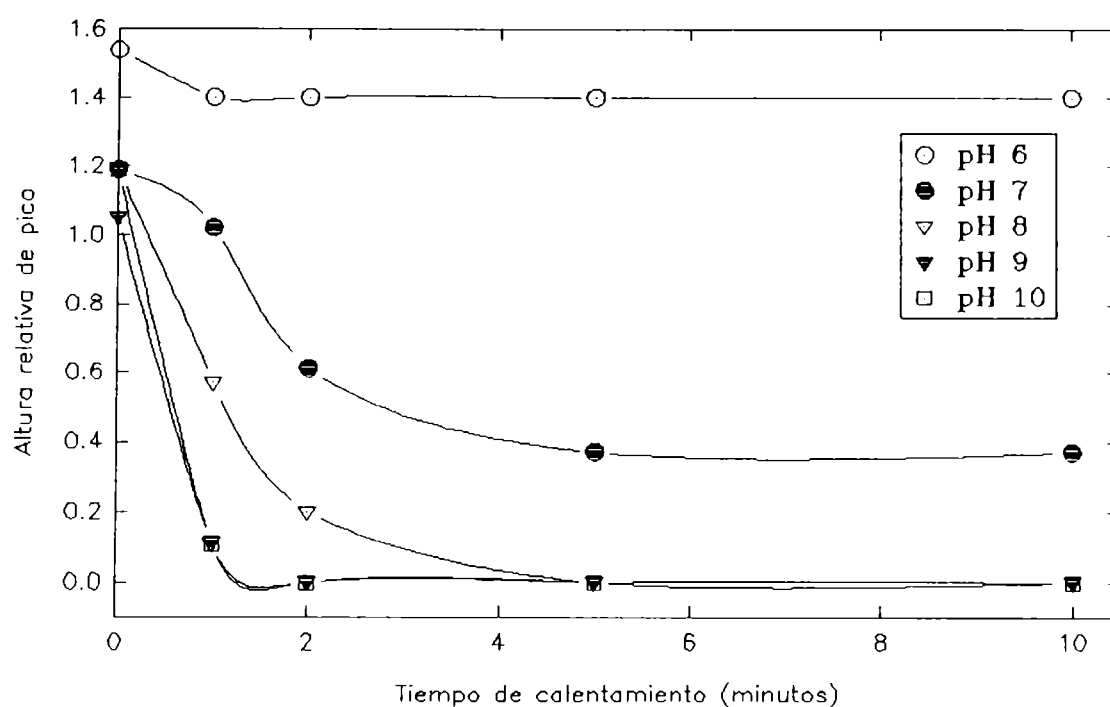
aislados. No se observaron modificaciones de las mismas por el agregado de HCl que causa la precipitación, ni por la adición de NaOH en la neutralización, por lo que los requerimientos de temperatura para la desnaturalización de estas globulinas son los mismos si el tratamiento térmico se realiza antes o después de la precipitación isoeléctrica (resultado no mostrado).

Se estudió también el efecto de la concentración de proteína en la agregación de la subunidad AB-11S. Tratamientos efectuados durante 6 minutos a 100°C produjeron una agregación del 64, 76 y 85% para concentraciones de proteína de 7, 28 y 70 mg/ml, respectivamente. Estos resultados indican que un incremento de la concentración de proteína favorece la agregación.

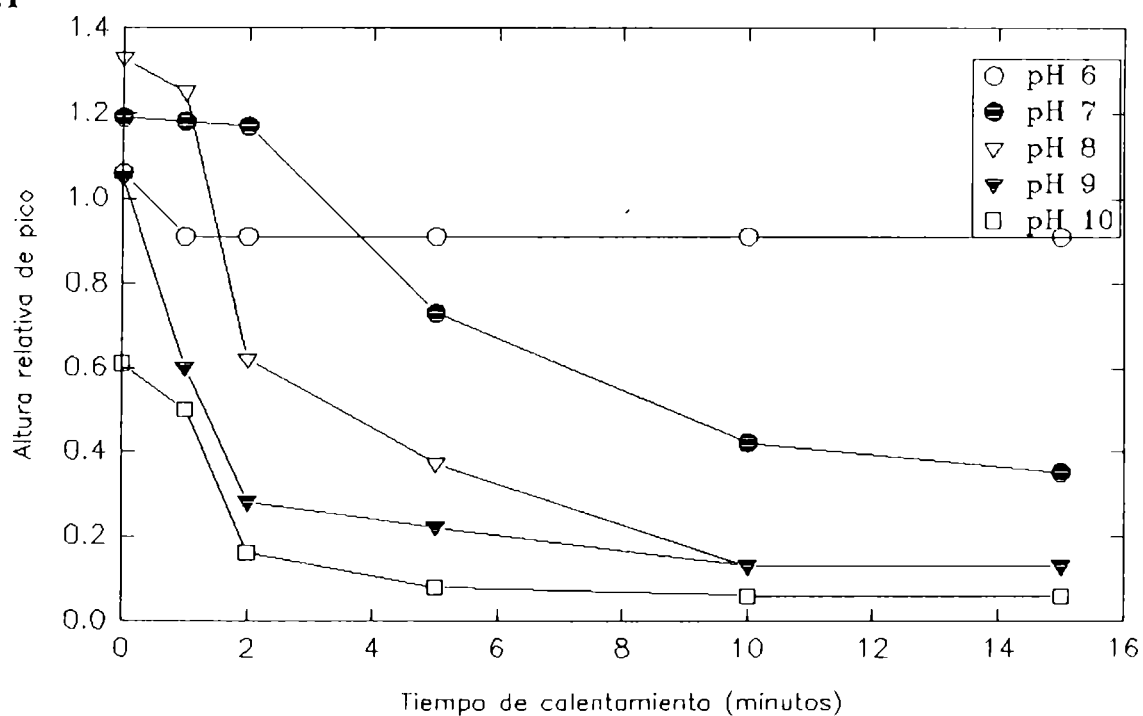
Se analizó además el efecto del pH en la agregación para lo cual se realizaron tratamientos térmicos de un aislado (14mg/ml) a pH 6, 7, 8, 9 y 10, a temperaturas de 90°C y 100°C, durante tiempos de hasta 15 minutos. En la **Figura 31** se muestra la relación de alturas de picos AB-11S/ β -7S en función del tiempo de calentamiento. Se observa que el incremento del pH de 7 a 10 favorece la agregación, requiriéndose menores tiempos de calentamiento para que ocurra una desaparición completa de la subunidad intermedia AB en los perfiles electroforéticos (5 minutos a pH 8 y 2 minutos a pHs 9 y 10). A pH 6 no se observa agregación. A 90°C se requieren tiempos superiores, no lográndose una desaparición total de la subunidad AB como la observada a 100°C. Las modificaciones detectadas en los perfiles de las proteínas de 20 y 29 Kdal también son favorecidas por el incremento del pH. Este produce la ruptura de la subunidad AB. Esta ruptura se observa al minuto de tratamiento a 100°C a pH 9 o 10. Luego de 2 minutos de calentamiento se detecta una disminución de la subunidad β -7S y del polipéptido B-11S lo que podría sugerir agregación β -B. La misma se incrementa al aumentar el pH de 8 a 10 y no se detecta a pH 7. Los tratamientos a 90°C no producen agregación de la subunidad β -7S y del polipéptido B-11S a ninguno de los pH estudiados.

El efecto del pH en el tratamiento térmico se puede explicar por una mayor ionización de los grupos R-SH (cuyo pK es del orden de 9), los que actúan promoviendo el intercambio sulfhidrilo libre/disulfuro, facilitando la ruptura de la subunidad AB y por ende interacción β -7S/B-11S. Damodaran y Kinsella (1982) y Utsumi y col (1984) observaron que la interacción entre la subunidad β -7S y el polipéptido B-11S producida por tratamientos térmicos a pH 8 en presencia de β -mercaptoetanol, es fundamentalmente de naturaleza

electrostática. De acuerdo a estos autores la agregación se vería favorecida por la proximidad de las condiciones de reacción por ellos utilizadas al punto isoeléctrico del polipéptido B (PI 8.0-8.5). Sin embargo nuestros resultados indican que esta agregación ocurre en mayor extensión a pH más altos y que en la misma intervienen uniones disulfuro.



31.1



31.2

Figura 31: Efecto del pH en la variación de la altura de pico de la subunidad AB en relación a la subunidad β en función del tiempo de calentamiento a 100°C (31.1) y a 90°C (31.2).

La necesidad de temperaturas superiores a 80°C para que se produzca agregación de AB puede significar tanto el requerimiento de una desnaturalización completa de la glicinina, como de un aporte de energía térmica para que ocurran reacciones de intercambio SH/SS. La escasez de polipéptidos libres A y B en los extractos sugieren que los mismos forman parte de los agregados. Yamagishi y col (1982 a) propusieron un modelo de agregación para la glicinina en el que en una primera etapa los dímeros AB, luego de la ruptura de la estructura cuaternaria de la glicinina, se acercarían a través de los polipéptidos B. Este acercamiento se vería facilitado por el pH de la reacción, cercano al punto isoeléctrico de B, en el que las repulsiones electrostáticas entre los mismos serían menores que las que se establecerían entre los polipéptidos ácidos. Posteriormente se formarían uniones disulfuro entre los polipéptidos básicos, las que estarían promovidas por la presencia de grupos SH_L en el polipéptido A. Como resultado de estas interacciones se formarían dímeros, trímeros, etc del polipéptido B, que se estabilizarían por la presencia del polipéptido A en su exterior. La pérdida de los polipéptidos A es la que ocasiona la insolubilización de los polipéptidos B, en sus distintos grados de agregación, quedando el polipéptido A soluble, este comportamiento es el típico de la disociación/asociación para la glicinina (Yamagishi y col 1982 a). La agregación de la subunidad AB observada en nuestro caso correspondería, de acuerdo con este modelo, a agregados de polipéptidos B solubles debido al efecto estabilizante de los polipéptidos A.

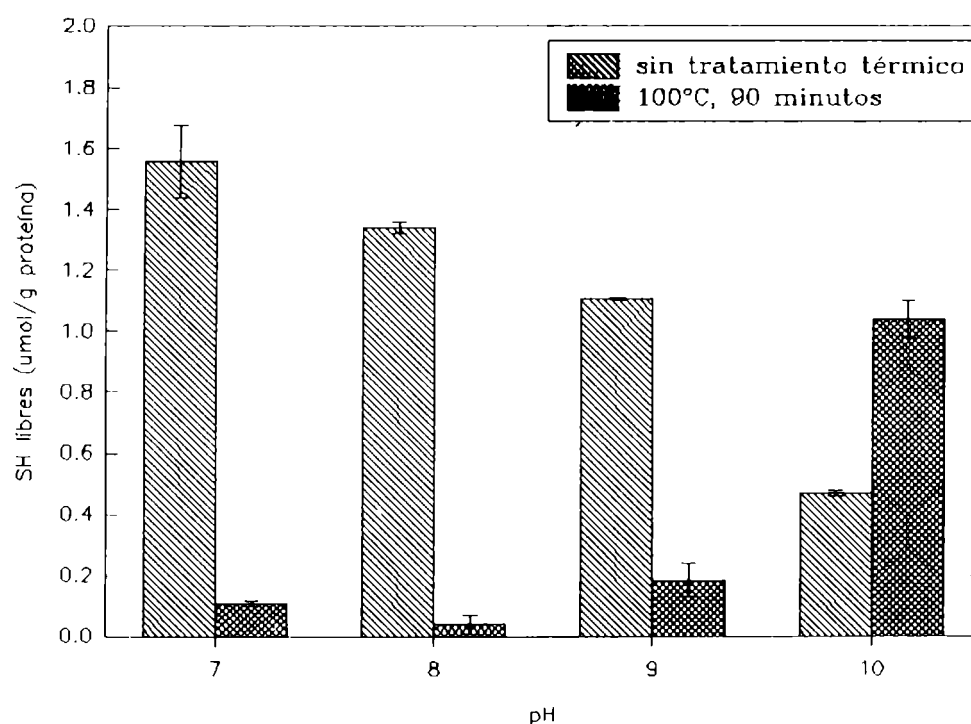


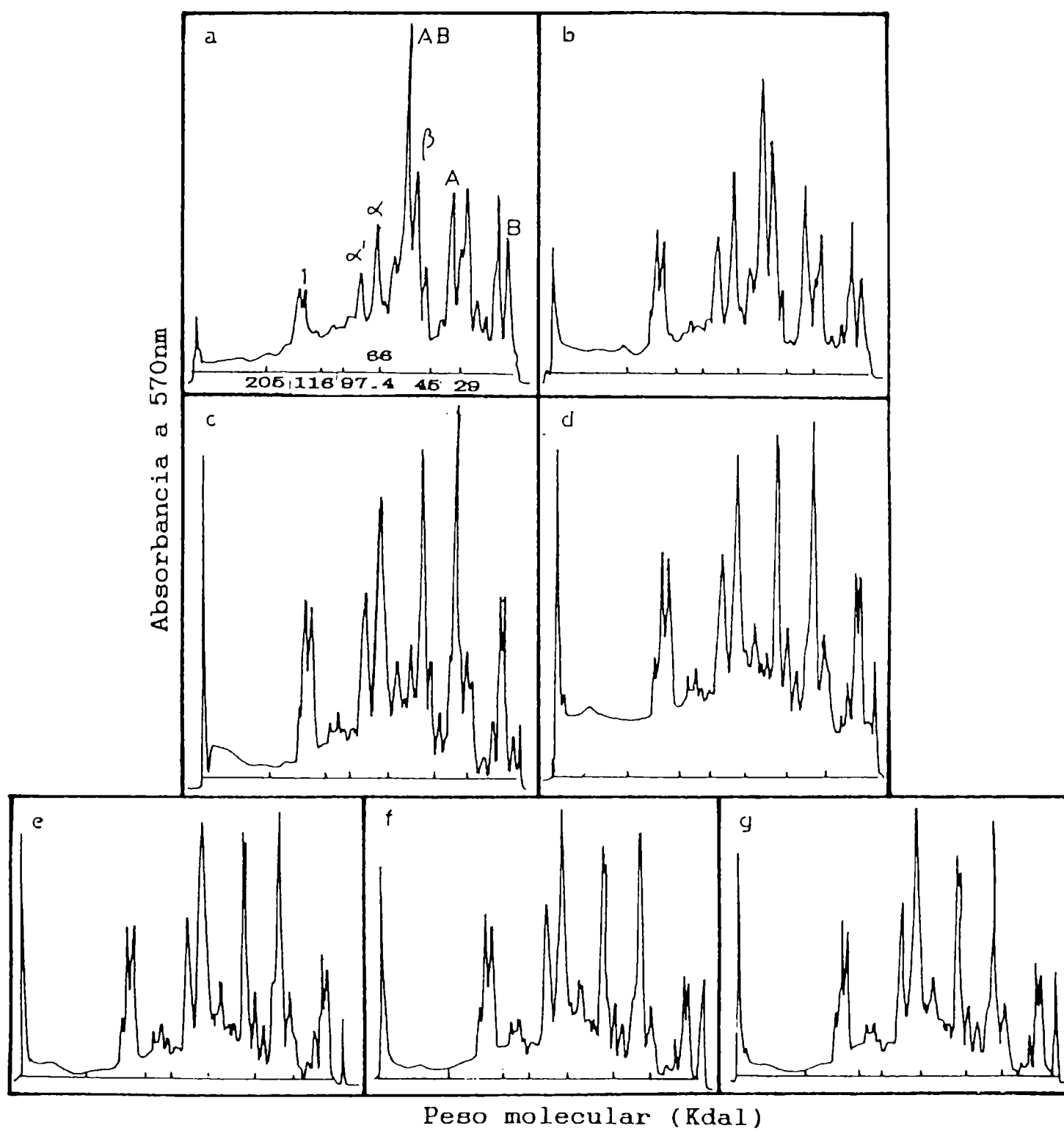
Figura 32: Valores de sulfhidrilos libres de aislados tratados a diferentes pHs a 25°C y a 100°C durante 90 minutos.

Dado que el tratamiento térmico influye en las reacciones de intercambio SH/SS decidimos analizar las modificaciones producidas en el contenido de grupos SH_L como consecuencia de tratamientos térmicos realizados a distintos pHs. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 32**. En la misma se observa que los aislados que no sufrieron tratamiento térmico, muestran una gradual disminución del número de grupos sulfhidrilos libres cuando el pH se incrementa de 7 a 9; a pH 10 esta disminución es mucho más marcada. Los valores de SH_L de aislados que sufrieron tratamiento térmico son mucho más bajos, excepto a pH 10, lo que indicaría que el tratamiento térmico está favoreciendo las reacciones de oxidación de grupos SH_L . El valor de sulfhidrilos totales no muestra variaciones significativas.

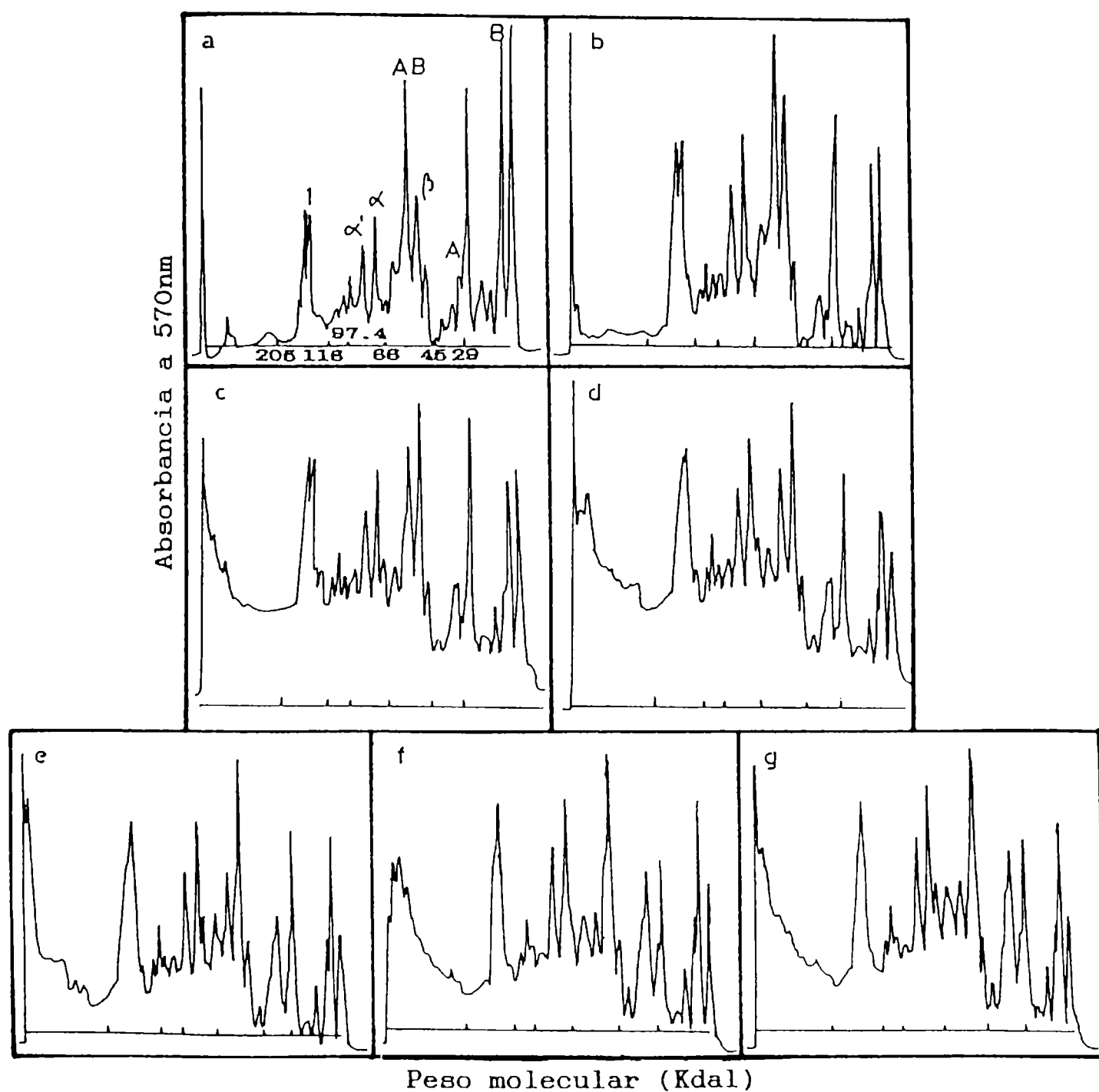
Por último se realizó un tratamiento térmico-reductor combinado a los efectos de determinar la influencia del sulfito en la agregación y estudiar la posibilidad de mejorar la reducción utilizando como agente desnaturalizante el calor. La concentración de Na_2SO_3 empleada (0.01 % p/v) se calculó de manera que alcance para una completa reducción de las uniones presentes en el aislado ($\approx 32\mu\text{mol/g}$). Los tratamientos se realizaron a una concentración de proteína de 14mg/ml a pH 7, a 90 y a 100°C. En las **Figuras 33 y 34** se muestran los perfiles electroforéticos y la variación en la relación de alturas de pico AB-11S/ β -7S calculadas en función del tiempo de tratamiento a 90 y 100°C, respectivamente. Las modificaciones observadas a tiempo cero se deben a la acción del Na_2SO_3 y son: reducción de los agregados de peso molecular 100-200 Kdal, incremento de α y α' ; pequeño incremento del polipéptido A y una pequeña disminución de la proteína de 29 Kdal. Con el tratamiento térmico se producen los siguientes cambios:

1. Disminución gradual de la subunidad AB, que es más marcada cuando existe sulfito presente que cuando está ausente.
2. Ruptura de la subunidad AB, a partir de los 2 minutos de tratamiento a 100°C, que se manifiesta por el incremento del polipéptido A.
3. Formación de agregados β -B a partir de los 2 minutos de tratamiento a 100°C, que se manifiesta por la disminución de la banda de la subunidad β -7S con respecto a α' y α -7S y porque el incremento en la altura de pico del polipéptido B-11S no guarda relación con el sufrido por el polipéptido A-11S.
4. La disminución de la proteína de 29 Kdal es más importante si existe sulfito en el medio. Esta fracción tanto por su comportamiento térmico como por su sensibilidad a

reductores puede tratarse de la 7S globulina básica.

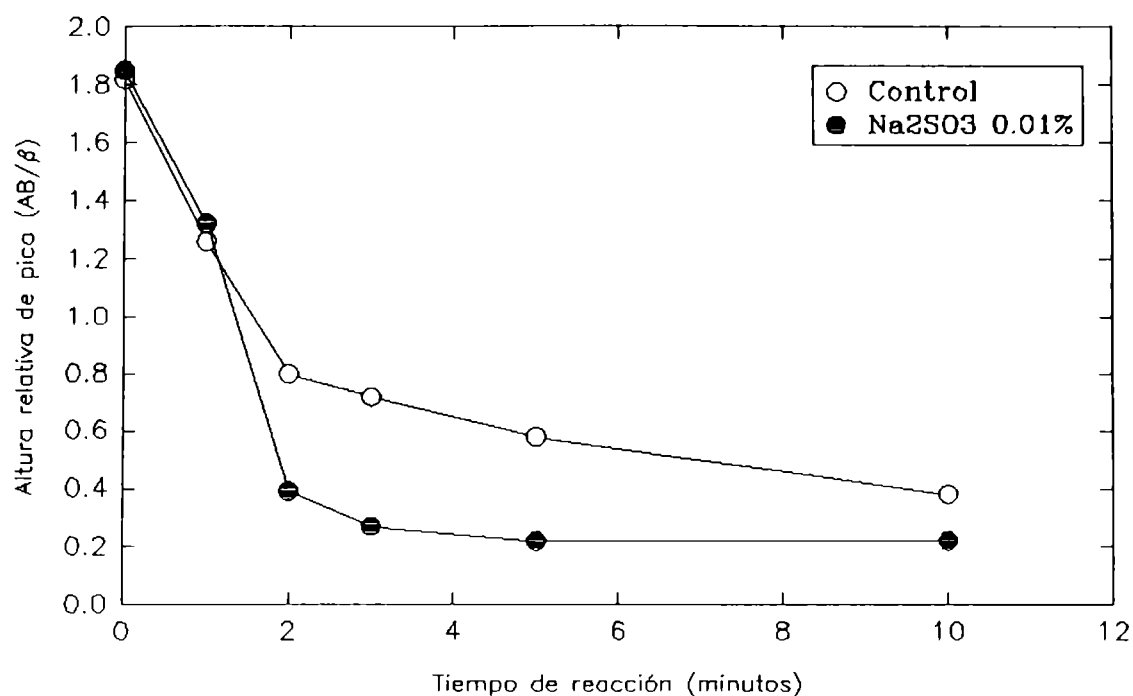


33.1

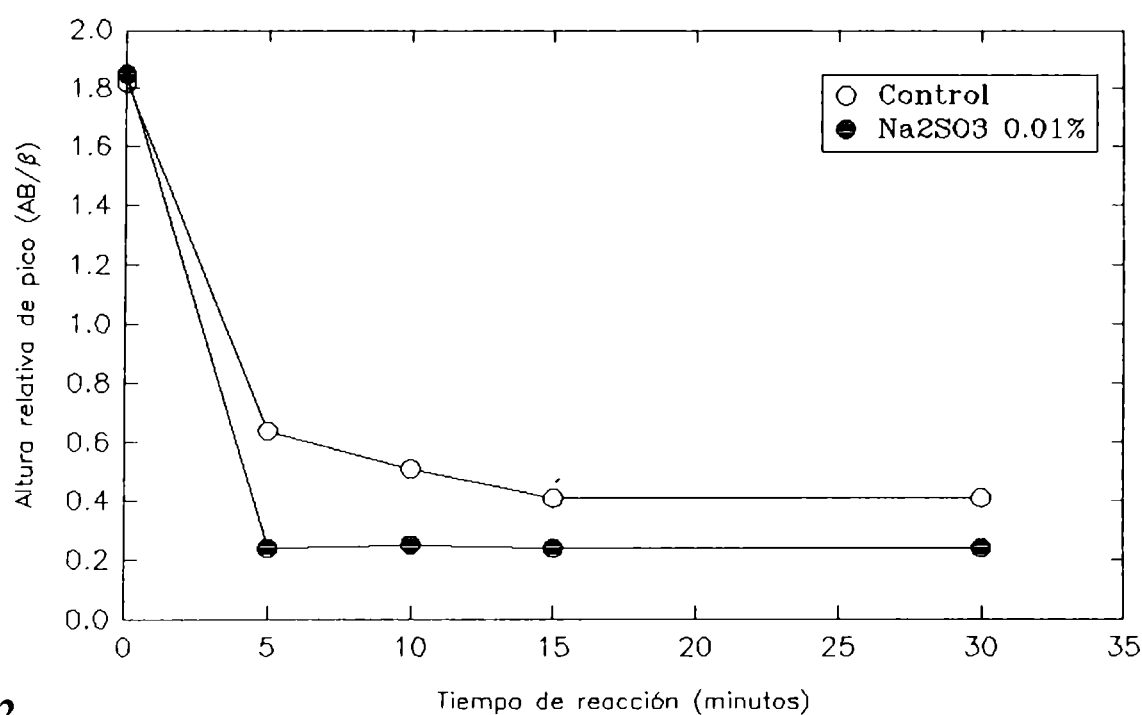


33.2

Figura 33: Densitogramas correspondientes a un gel SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15% de aislados proteicos de soja (14mg/ml) tratados a 100°C, en presencia de Na₂SO₃ 0.01% p/v (33.1) y en su ausencia (33.2), durante tiempos de 0; 1; 2; 3; 5; 10 y 15 minutos para las figuras a, b, c, d, e, f y g respectivamente.



34.1



34.2

Figura 34: Variación de la altura de pico de la subunidad AB en relación a la subunidad β , en función del tiempo de calentamiento a 100°C (34.1) y a 90°C (34.2) de aislados proteicos de soja 14mg/ml sin tratamiento reductor (control) y tratados con Na₂SO₃ 0.01 %.

Estos resultados indicarían que la presencia de un reductor en el medio promueve la ruptura de la subunidad AB y la agregación de las subunidades β y B. La agregación β -B cuando el tratamiento térmico se realiza en presencia de reductores también ha sido

informada por German y col 1982; Damodaran y col 1982 y Utsumi y col 1984; quienes afirman que las interacciones β -B son de tipo electrostáticas y se requiere una determinada conformación de la subunidad β para que la misma ocurra. Además observan que en estas condiciones de tratamientos térmicos se forman dímeros, trímeros, etc. del polipéptido B por uniones disulfuro (Utsumi y col 1984).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que la agregación de la subunidad intermedia AB de la glicinina requiere tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 85°C, necesitándose tiempos notablemente menores si el tratamiento se realiza a pHs 9 o 10. El incremento de la concentración del aislado favorece dicha agregación aunque la misma ocurre a concentraciones menores de 10 mg/ml.

La presencia de sulfito de sodio o el incremento del pH favorece la agregación β -7S/B-11S, probablemente debido a que facilita la disociación de la subunidad AB. Dichos agregados también se observan cuando el tratamiento térmico se realiza en presencia de β -mercaptoetanol 20mM (Utsumi y col 1984).

Tanto la agregación de la subunidad AB como la de las subunidades β -7S y polipéptido B-11S ocurren por reacciones de intercambio SH/SS (Yamagishi y col 1980; 1981 a y b; 1982 a; Mori y col 1982 a y b; Yamagishi y col 1987). De acuerdo a nuestros resultados para que ocurra agregación β -7S/B-11S, es necesario algo más que la ruptura de la subunidad intermedia AB, ya que la misma se produce cuando los aislados son tratados térmicamente a pH 7 durante 20 minutos, condición en la que no se detecta agregación β -7S/B-11S. La formación de estos agregados requiere un incremento en la cantidad de grupos SH_L, que ocurre tanto en presencia de agentes reductores como por aumento del pH (debido a la mayor ionización de los grupos R-SH existentes) que favorece el intercambio SH/SS). Los agregados β -7S/B-11S se estabilizarían en estado avanzado de formación a través de uniones disulfuro.

El uso de tratamientos térmicos como agente desnaturalizante, para promover la reducción de la subunidad AB por acción del sulfito, no es factible debido a que es necesario alcanzar la temperatura de desnaturalización para que el mismo acceda a las uniones no expuestas y a esta temperatura empiezan a ocurrir reacciones de agregación que dificultan dicho acceso.

Sección 4

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

La medida de algunas propiedades estructurales como hidrofobicidad superficial (Kato y Nakai, 1980; Townsend y Nakai, 1983; Voutsinas y col 1983 a y b; Hayakawa y Nakai, 1985 a y b; Nakai y col 1991), grado de asociación-disociación, estabilidad, carga neta, tamaño molecular (Kato, 1991) se está utilizando con el fin de predecir la funcionalidad de las proteínas. Otras propiedades que también se evalúan son solubilidad, viscosidad, número de sulfhidrilos libres y totales las cuales aportan información sobre la estructura proteica, así por ejemplo la solubilidad es reflejo del balance de carga e hidrofobicidad de la molécula proteica (Bigelow, 1967; Hayakawa y Nakai, 1985 a y b); la viscosidad de los efectos estéricos e interacciones intermoleculares y el número de grupos sulfhidrilos libres y disulfuros aporta información sobre la flexibilidad molecular y la capacidad de producir "crosslinking" (Nakai y col 1991; Kato, 1991). La posible relación existente entre características estructurales y funcionales es de sumo interés ya que su conocimiento permitirá dirigir modificaciones de la estructura hacia la producción de proteínas con mejores propiedades funcionales.

Previamente hemos analizado el efecto de tratamientos térmicos en diferentes condiciones sobre el grado de agregación de los componentes mayoritarios de los aislados proteicos de soja determinándose condiciones con las cuales es posible producir agregación de la subunidad intermedia AB a través de uniones disulfuro, agregación de β -7S y B-11S, reducciones totales y parciales, etc. Teniendo en cuenta los resultados alcanzados se realizaron distintos clases de tratamientos: **1-** térmicos prolongados a alta concentración de proteína a fin de producir aislados con un alto grado de agregación; **2-** térmicos cortos a baja concentración de proteína a fin de inducir la desnaturalización y un bajo grado de agregación; **3-** cambio en la proporción de las fracciones 7S y 11S, a fin de determinar la contribución de estos componentes mayoritarios a las características del aislado; **4-** reducción completa de la subunidad intermedia AB de la glicinina, a fin de evaluar la contribución de los polipéptidos A y B; **5-** reducción parcial del aislado. En la **Tabla 10** se resumen las condiciones de obtención, junto con el número con que se identifica cada aislado. En primer lugar, se analizarán las modificaciones en el estado de asociación-disociación, hidrofobicidad superficial, peso molecular medio y grado de desnaturalización producidas por los distintos tratamientos, en segundo lugar se analizará su incidencia en la funcionalidad: solubilidad, capacidad de absorción de agua, viscosidad y propiedades de superficie. Finalmente se estudiará la relación existente entre las propiedades estructurales y funcionales de los

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

aislados.

Tabla 10: Condiciones de tratamiento de los aislados proteicos.

Aislado	Características	Tratamiento térmico	Tratamiento Na ₂ SO ₄	Diálisis
1	pH 7	-	-	-
2	pH 7	98°C 5'	-	-
3	pH 7	98°C 30'	-	-
4	pH 9	-	-	-
5	pH 9	98°C 5'	-	-
6	pH 9	98°C 30'	-	-
Aislado	Composición	Tratamiento urea 6M	Tratamiento Na ₂ SO ₄	Diálisis
7	Normal	-	-	+
8	Normal	-	0.05 %	+
9	Normal	+	0.05 %	+
10	Rico en 7S	-	-	+
11	Rico en 7S	-	0.05 %	+
12	Rico en 7S	+	0.05 %	+
13	Rico en 11S	-	-	+
14	Rico en 11S	-	0.05 %	+
15	Rico en 11S	+	0.05 %	+
Aislado	Características	Tratamiento térmico	Tratamiento Na ₂ SO ₄	Diálisis
16	pH 7	80°C	-	+
17	pH 7	92°C	-	+
18	pH 7	-	2 %	+
19	pH 7	80°C	2 %	+
20	pH 7	92°C	2 %	+

1. Propiedades estructurales

1.1. Grado de desnaturalización

Se determinó el grado de desnaturalización de los aislados por calorimetría diferencial de barrido. Los resultados obtenidos muestran que tanto los aislados que sufrieron un tratamiento térmico a alta temperatura (98°C- 30 minutos y 92°C) (aislados 3, 6 y 17), como los tratados con Na_2SO_3 y urea (aislados 9, 12 y 15) se encuentran completamente desnaturalizados (**Tabla 11**).

Los aislados 2, 5 y 16, que fueron sometidos a un calentamiento en condiciones menos drásticas, menor tiempo y/o menor temperatura, poseen la fracción 7S completamente desnaturalizada y la 11S parcialmente nativa. Considerando el área por unidad de masa de las endotermas obtenidas surge que el 66.4%, 48.0% y 32.8% de la globulina 11S no es afectada para los aislados 2, 5 y 16, respectivamente, lo que muestra claramente el efecto ejercido por el pH durante el tratamiento térmico. Los resultados obtenidos indican un aumento del grado de desnaturalización y una disminución de la estabilidad térmica de la globulina 11S con el aumento de la alcalinidad del medio. Se puede observar también que la disminución de la concentración de proteínas de 10 a 4 % p/v a la que se efectúa el tratamiento térmico (80°C) favorece la desnaturalización (muestras 2 y 16).

En cuanto al tratamiento con Na_2SO_3 es evidente que el mismo no modifica los valores de entalpía y temperaturas de desnaturalización de las proteínas de soja, excepto que este acompañado por tratamiento térmico. En este último caso puede observarse un menor grado de desnaturalización de la fracción 11S correspondiente a los aislados tratados con Na_2SO_3 2% p/v ($\mu = 0.48\text{M}$) a 80 y 90°C (muestras 19 y 20) que la detectada para aquellas muestras sometidas a igual tratamiento térmico en un medio no reductor de menor fuerza iónica (muestras 16 y 17). La eliminación del Na_2SO_3 del medio, por diálisis, hace desaparecer el efecto salino provocando una disminución de la temperatura de pico de la globulina 11S (aislados 18, 19 y 20).

Por último se observa que los aislados precipitados a pH 6.4 y 4.8 (aislados 10 y 13) poseen ambas fracciones. El aislado 10 presenta un 65.8% de 7S y un 34.2% de 11S; el aislado 13 tiene un 17.0% de 7S y un 83.0% de 11S. Los aislados habituales tienen un contenido de 7S y 11S que oscilan en el orden de 36% y 63% respectivamente. Estos

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

valores fueron calculados a través de las entalpías de desnaturalización, considerando el porcentaje del área total que corresponde a 7S y a 11S.

Tabla 11: Entalpías y temperaturas de desnaturalización de los aislados.

Aislado	ΔH_{7S} (J/g)	ΔH_{11S} (J/g)	T_D 7S(°C)	T_D 11S (°C)
1	6.46 ± 0.42	10.31 ± 0.63	74.59 ± 0.24	90.69 ± 0.02
2	0	6.81 ± 1.24	-	90.96 ± 0.23
3	0	0	-	-
4	3.67 ± 0.21	6.29 ± 0.75	74.82 ± 0.01	87.34 ± 0.02
5	0	2.97 ± 0.24	-	87.84 ± 0.01
6	0	0	-	-
7	5.59 ± 1.03	9.96 ± 0.82	75.31 ± 0.36	89.74 ± 0.25
8	6.46 ± 0.19	10.83 ± 0.37	74.56 ± 0.24	90.68 ± 0.01
9	0	0	-	-
10	8.21 ± 1.00	3.84 ± 0.03	74.31 ± 0.01	90.73 ± 0.01
11	7.69 ± 0.72	4.02 ± 0.93	74.67 ± 0.23	91.56 ± 0.24
12	0	0	-	-
13	3.32 ± 0.70	15.20 ± 0.75	78.20 ± 0.20	91.93 ± 0.24
14	1.75 ± 0.12	8.91 ± 0.09	75.86 ± 0.48	92.67 ± 0.01
15	0	0	-	-
16	0	3.32 ± 0.24	-	92.03 ± 0.48
17	0	0	-	-
18	5.59 ± 0.66	9.44 ± 0.21	75.62 ± 0.24	89.62 ± 0.48
19	0	8.21 ± 0.26	-	88.42 ± 0.24
20	0	3.84 ± 0.35	-	89.14 ± 0.48

1.2. Contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales.

En la **Figura 35** se muestran los valores de sulfhidrilos libres (SH_L) (35.1) y totales

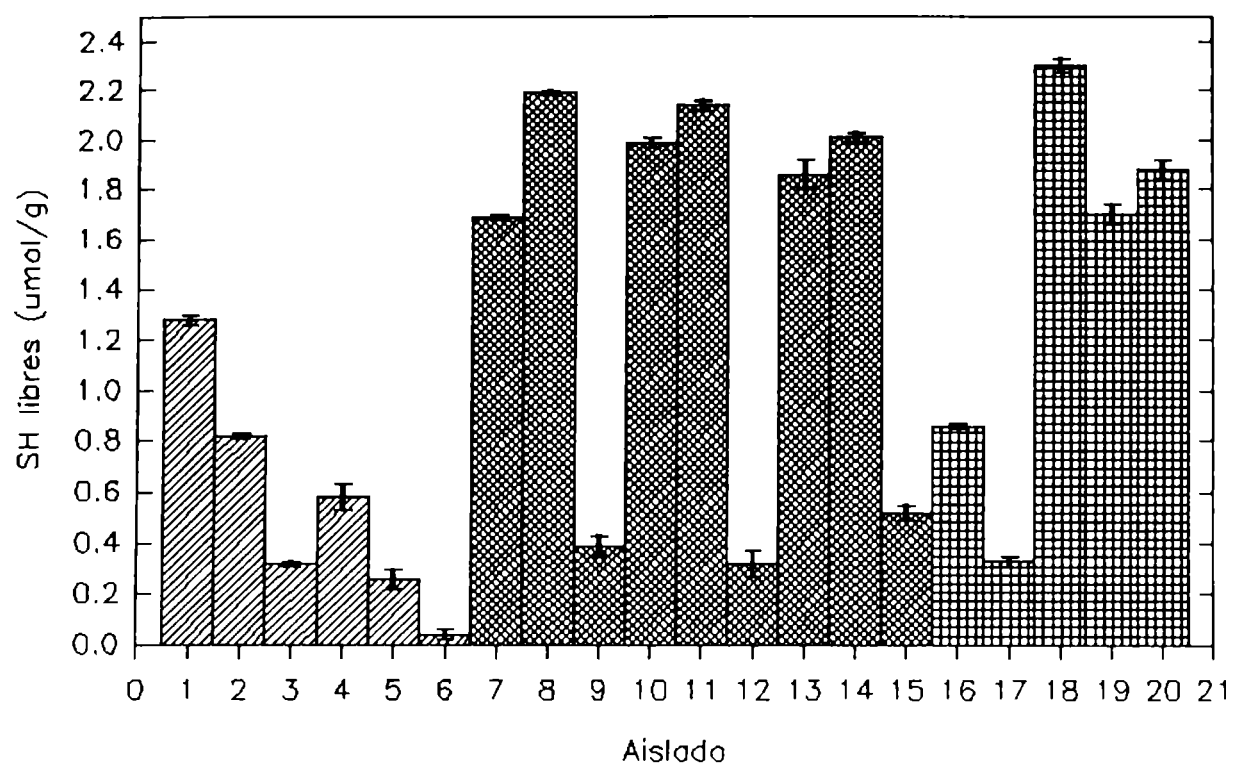
(SH_T) (35.2) obtenidos para las muestras descritas en la **Tabla 10**. Puede observarse que todos los aislados que sufrieron tratamientos exclusivamente con sulfito presentan valores de SH_L superiores a 2 μ moles/g (aislados 8; 11; 13 y 18) mientras que los aislados que sólo fueron tratados térmicamente poseen un contenido de SH_L inferior a 0.8 μ moles/g. El valor normal de un aislado nativo es 1.5-1.8 μ moles/g.

Los aislados 9; 12 y 15 que sufrieron desnaturalización completa por la acción de la urea presentan un contenido de sulfhidrilos libres bajo. Este agente produce una exposición de los grupos SH_L internos que favorece su oxidación luego de eliminado el reductor. Los aislados más ricos en las fracciones 7S y 11S (muestras 10 y 13) presentan valores de SH_L del mismo orden que un aislado nativo.

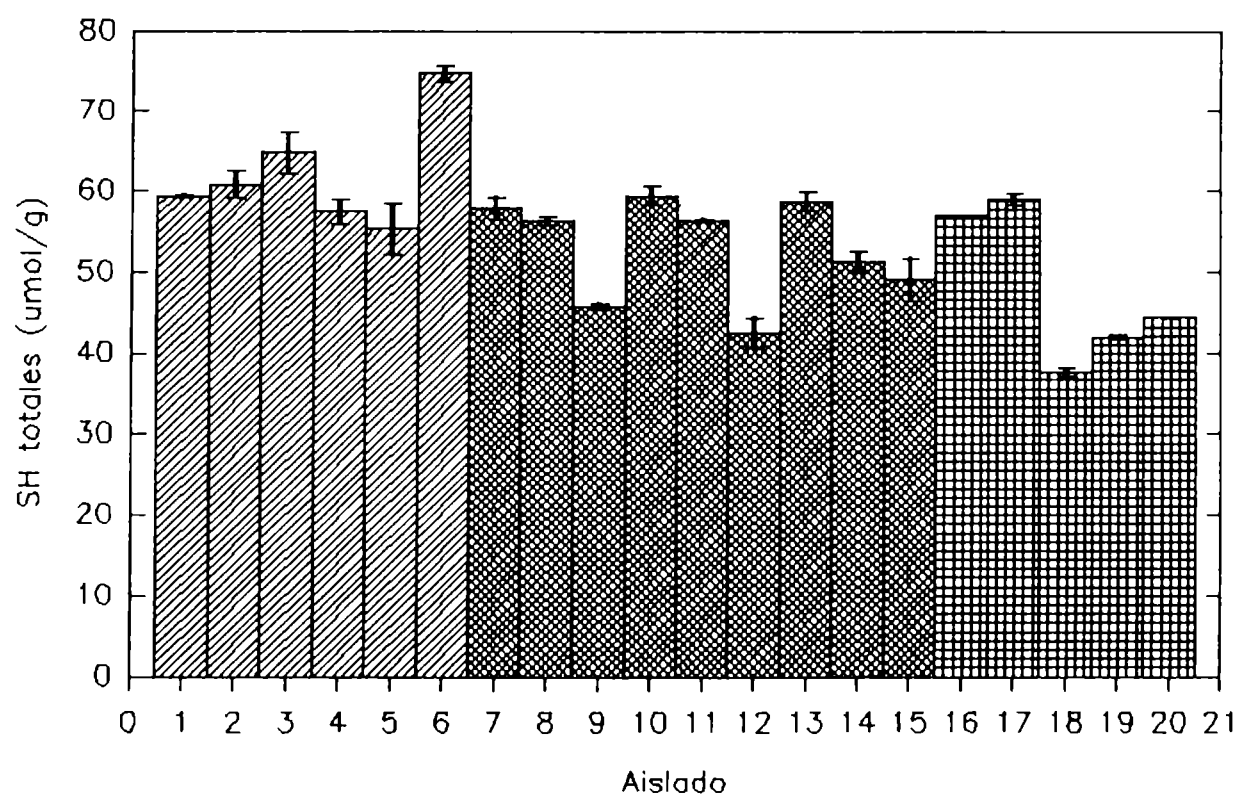
Al efectuar tratamientos térmicos los valores de sulfhidrilos totales deben permanecer constantes ya que la oxidación de grupos SH_L origina uniones disulfuro. La reducción con Na₂SO₃ produce sulfonación, los grupos R-SO₃⁻¹ formados no reaccionan con el NTSB, por lo que la diferencia entre los SH_T y SH_L da el grado de sulfonación logrado durante el tratamiento reductor. Los aislados 8; 11 y 14 presentan una leve disminución de SH_T con respecto a los controles (muestras 7; 10 y 13) de un 3.6%, 5.6% y 13.7%, respectivamente, en cambio, los aislados 9; 12 y 15 que fueron sometidos a tratamientos reductores en presencia de urea presentan una disminución de SH_T de 19.2%, 21.2% y 14.6% respectivamente. Estos valores corresponden al porcentaje de grupos sulfonatos incorporados. En el caso de los aislados 18; 19 y 20 la sulfonación alcanzada con respecto a un aislado sin tratamiento (7) fue 37.1%, 28.3% y 24.4%. En este caso el tratamiento térmico no mejora la reducción ya que es incapaz de mejorar el acceso del sulfito, debido al efecto estabilizador que ejerce el incremento de la fuerza iónica.

Los tratamientos realizados con Na₂SO₃ 0.05% p/v, produjeron sulfonaciones muy bajas debido a la escasa cantidad de reductor presente lo que no permite un buen desplazamiento de la reacción de reducción. Cuando el tratamiento reductor se realizó en presencia de urea se logró una completa reducción de los dímeros AB, pero la sulfonación siguió siendo baja (sólo se incorporaron entre 8-15 μ moles RSO₃⁻¹/g aislado). Con Na₂SO₃ 2% p/v se logra una mejor sulfonación: se incorporan 21; 16 y 14 μ moles RSO₃⁻¹/g aislado. Las modificaciones producidas en la carga neta del aislado por incorporación de grupos sulfonatos son, por lo tanto, pequeñas. La sulfonación en el caso de los aislados 9; 12 y 15 afecta fundamentalmente a las uniones SS comprometidas en la unión de los polipéptidos A y B de

la subunidad intermedia AB, mientras que en el caso de los aislados 18; 19 y 20 es principalmente superficial ya que la estructura globular está estabilizada.



35.1

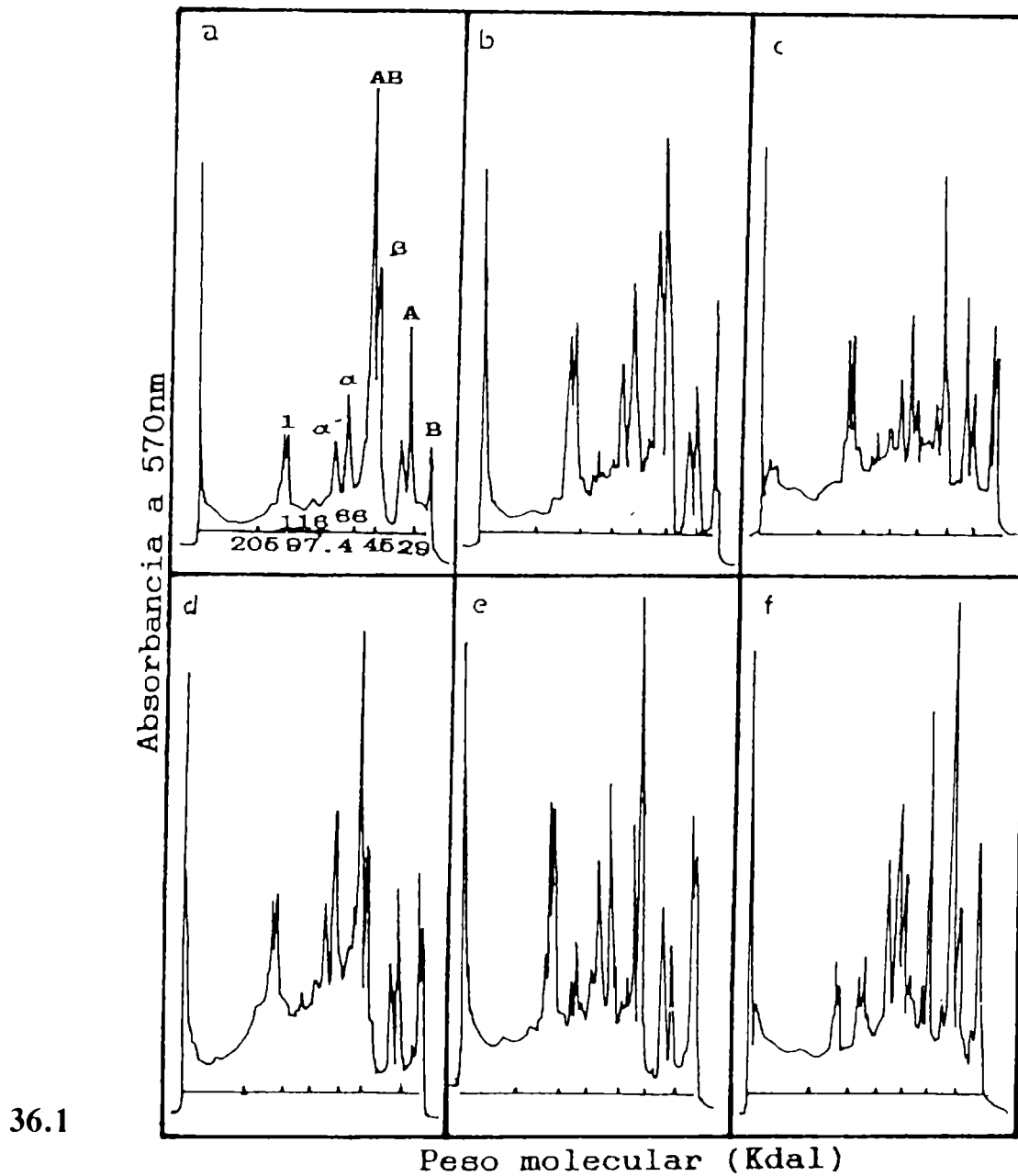


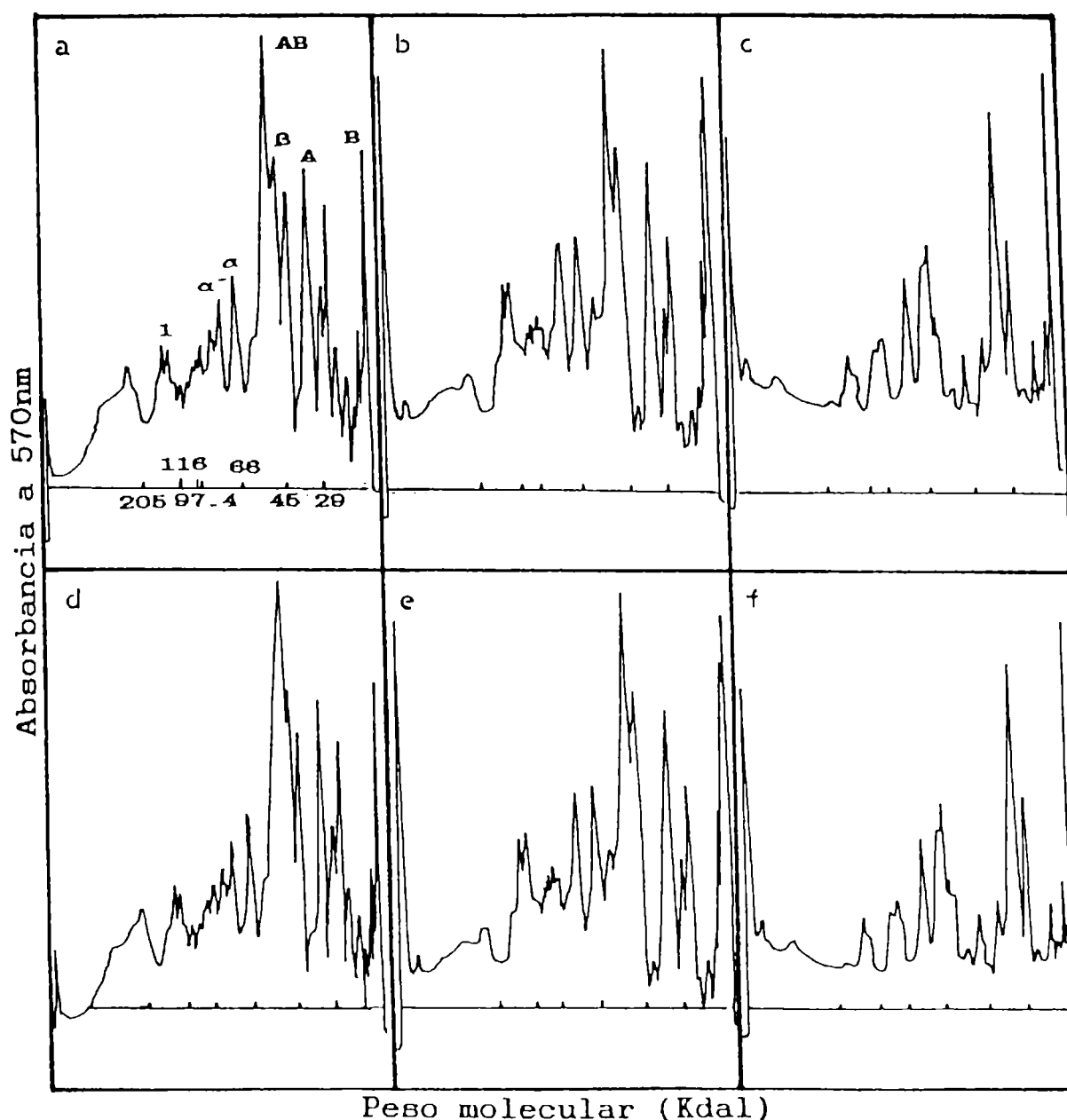
35.2

Figura 35: Valores de sulfhidrilos libres (35.1) y totales (35.2) de los aislados estudiados.

1.3. Grado de asociación-disociación.

En la **Figura 36** se presentan los perfiles electroforéticos de los aislados 1-6. En la parte **1** se muestran las fracciones solubles en un buffer 0.1% SDS y en la parte **2** las solubles en agua. En la misma se observa que el tratamiento térmico a 98°C produce agregación de la subunidad intermedia AB, la cual es parcial para períodos de calentamientos cortos (5 minutos) y total para el caso de tiempos más prolongados (30 minutos). Si dichos calentamientos se realizan a pH 9 se produce además ruptura de la subunidad intermedia AB puesta en evidencia por las proporciones de los picos correspondientes a los polipéptidos A y B las que están aumentadas en relación a la subunidad β -7S. La composición de las fracciones solubles en buffer urea de estos aislados es equivalente a la de las fracciones solubles en buffer SDS.



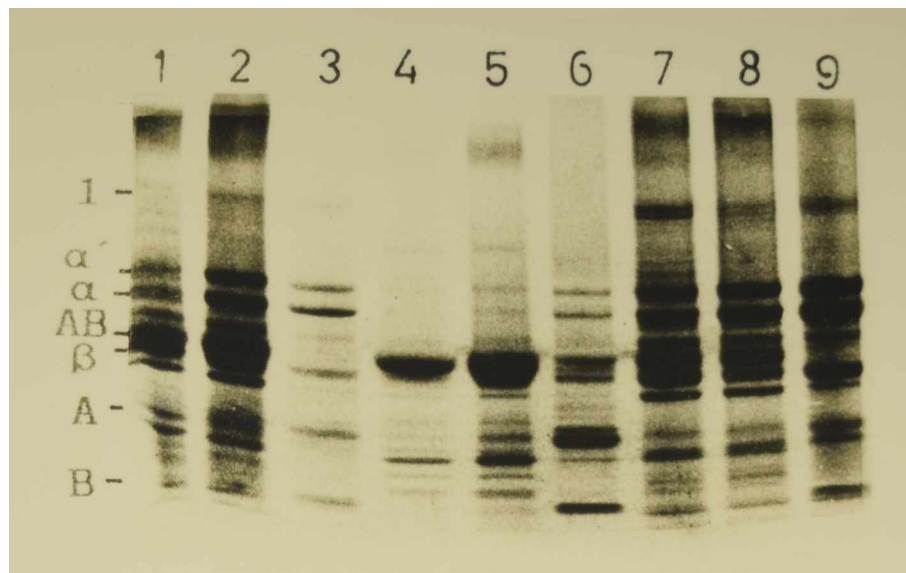


36.2

Figura 36: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE, en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%, en ausencia de β -mercaptoetanol: **36.1** Fracciones solubles en buffer con 0.1 % p/v SDS; **36.2** Fracciones solubles en agua. Aislados 1 (a); 2 (b); 3 (c); 4 (d); 5 (e) y 6 (f).

Los perfiles de las fracciones solubles en agua muestran, las diferencias más notables entre los 5 y 30 minutos de tratamiento a 98°C efectuados a pH 7 o 9. Los primeros tienen la misma composición y proporción de subunidades solubles que las mostradas con SDS, mientras que los segundos presentan una elevada proporción del polipéptido A y una notable

disminución de la subunidad β y del polipéptido B (**Figura 36.2**). Esto indica que los tratamientos efectuados durante 30 minutos producen agregados β -7S/B-11S a través de interacciones que se rompen por la acción de la urea o el SDS; estos agregados son insolubles en agua.



Fotografía 10: Electroforesis SDS-PAGE en gradiente de poliacrilamida 5-15 %, en ausencia de β -mercaptoetanol de los aislados 7; 8; 9; 13; 14; 15; 10; 11 y 12 para las calles 1-9, respectivamente.

En la **Fotografía 10** se muestran las electroforesis de las muestras 7-15. En la misma se observa un aumento en la proporción de la subunidad intermedia AB en los aislados más ricos en la globulina 11S (muestra 13, 14 y 15) en relación a un aislado de composición normal (aislado 7). También se detecta una disminución en la proporción de dicha subunidad en los aislados enriquecidos en la fracción 7S (muestras 10, 11 y 12). Los tratamientos con Na_2SO_3 producen un incremento de las subunidades α y α' -7S, no observándose un aumento de los polipéptidos A y B. La reducción en presencia de urea produce una completa disociación de la subunidad AB-11S (muestras 9, 12 y 15). Las electroforesis de las fracciones solubles en agua, realizadas en presencia o en ausencia de mercaptoetanol, muestran que ninguno de estos aislados presentan agregados β -7S/B-11S y que los polipéptidos A y B producidos por la acción del Na_2SO_3 en presencia de urea son solubles en agua.

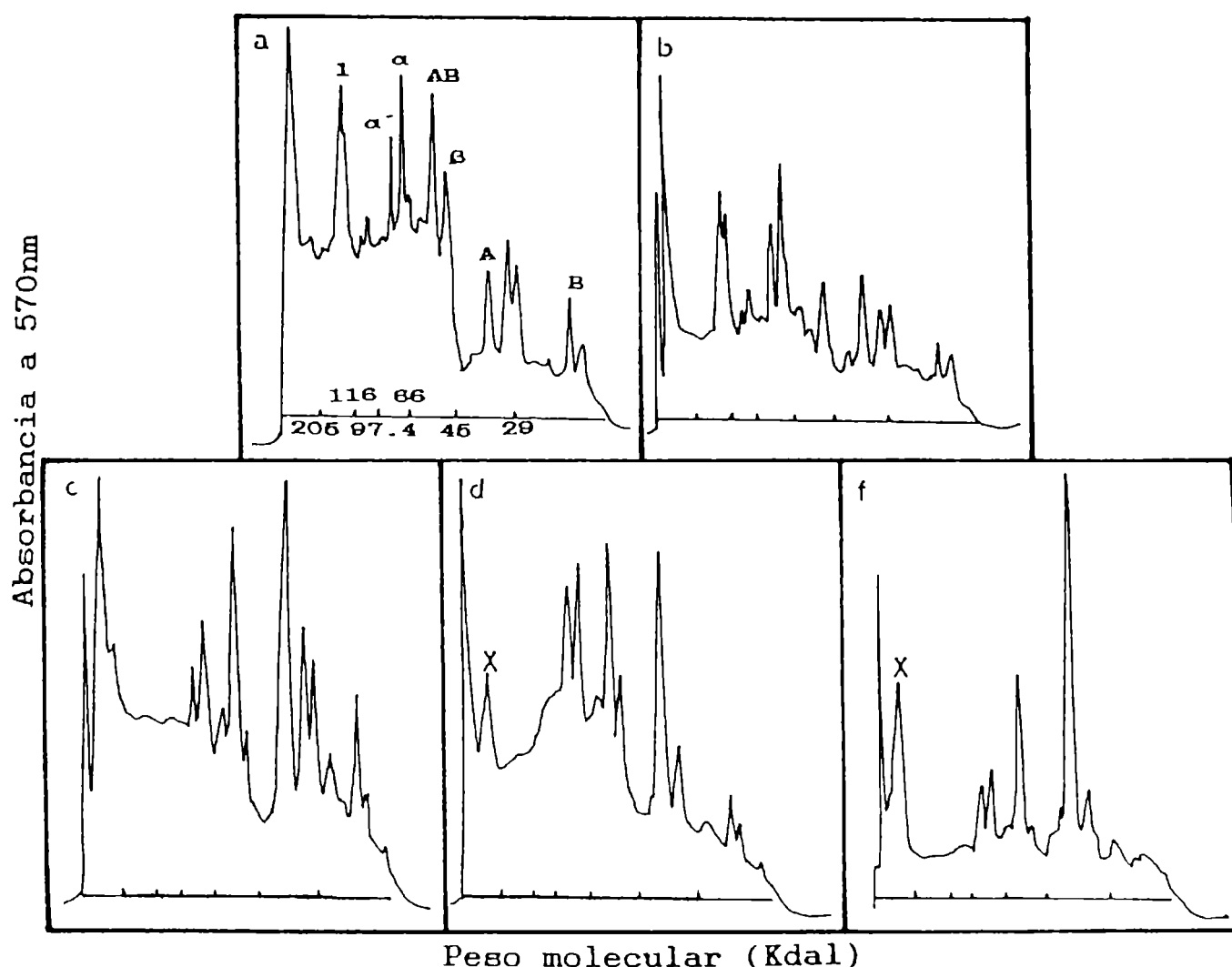
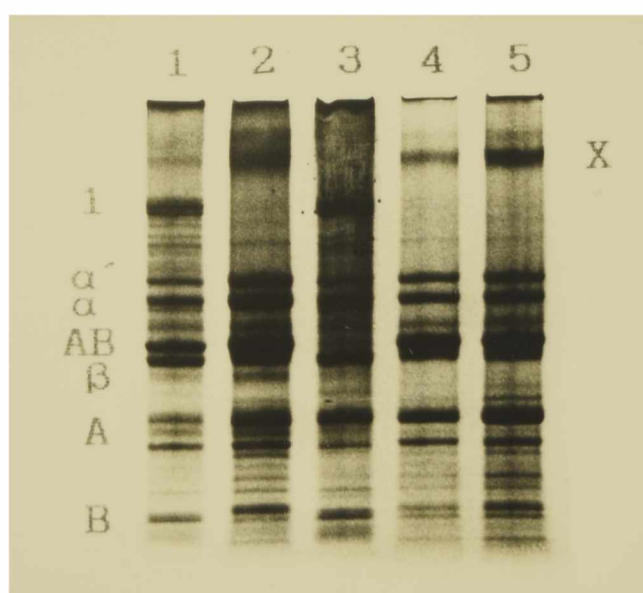


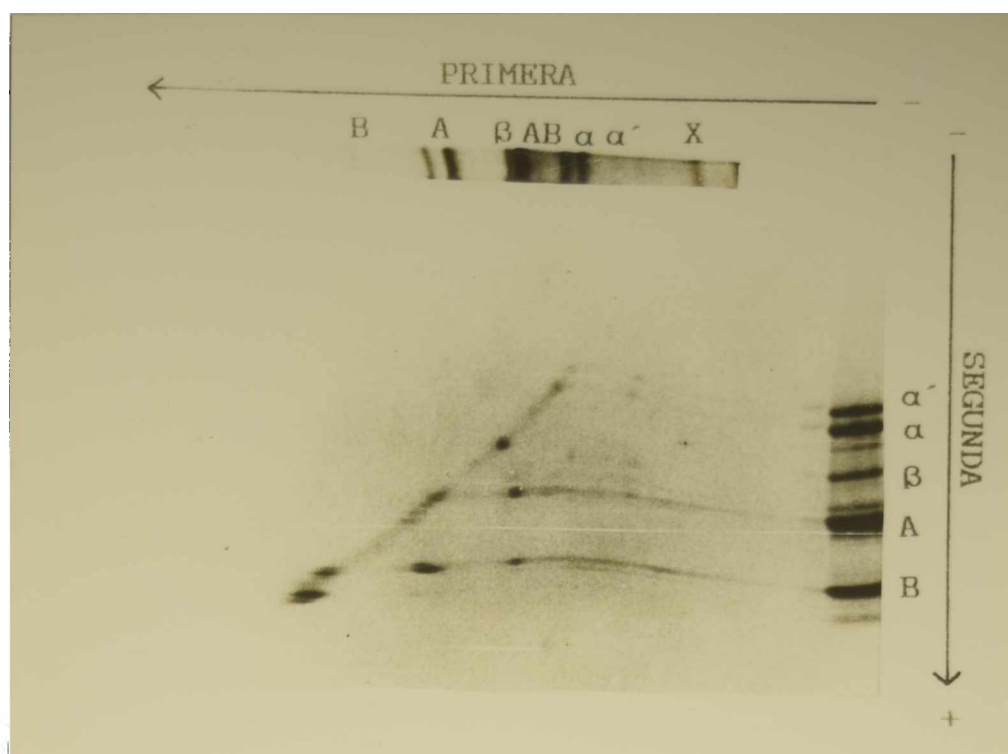
Figura 37: Densitogramas correspondientes a una electroforesis SDS-PAGE, en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15 %, en ausencia de β -mercaptoetanol de las fracciones solubles en buffer con 0.1 % de SDS de los aislados 16 (a); 17 (b); 18 (c); 19 (d) y 20 (e).

En la **Fotografía 11** y en la **Figura 37** se muestran las electroforesis y densitogramas correspondientes a las muestras 16-20. No se observaron diferencias significativas entre los perfiles de las fracciones solubles en agua, urea y SDS, por lo que únicamente se presentan las fracciones solubles en SDS. Los aislados sin tratamiento reductor (muestras 16 y 17) presentan el agregado 1, que no aparece en las muestras reducidas; además el aislado 16, que fue tratado a 80°C, posee la subunidad AB-11S mientras que la muestra tratada a 92°C (aislado 17) carece de la misma ya que está completamente agregada. Ninguno de los aislados reducidos con Na_2SO_3 2% p/v sufrió agregación de la subunidad AB, ya que dicha

concentración estabiliza la estructura de la glicinina por lo que el tratamiento a 92°C produce una desnaturalización parcial de la misma. Estos aislados a su vez poseen un incremento en la proporción del polipéptido A-11S, que no es acompañada de un incremento del polipéptido B-11S, y una disminución de la subunidad β -7S. Además se observa la presencia de un agregado de alto peso molecular (X), que no se encuentra en las muestras libres de sulfito. Se determinó la composición de este agregado por electroforesis bidimensional (primera dimensión SDS-PAGE, segunda dimensión SDS-PAGE con mercaptoetanol) observándose que está compuesto por los polipéptidos A y B de glicinina (**Fotografía 12**). La presencia de agregados de A y de B de menor tamaño molecular que los que se forman por tratamiento térmico en ausencia de Na_2SO_3 se puede atribuir a la sulfonación superficial y/o falta de la apertura de la estructura globular que produce esta concentración de sulfito lo que limita la posibilidad de formación de polímeros. Este agregado se encuentra aún en muestras sin tratamiento térmico (aislado 18) lo que se puede explicar por la formación de uniones disulfuro durante la liofilización de grupos sulfhidrilos libres originados por reducción de uniones disulfuro expuestas en la superficie de la glicinina.

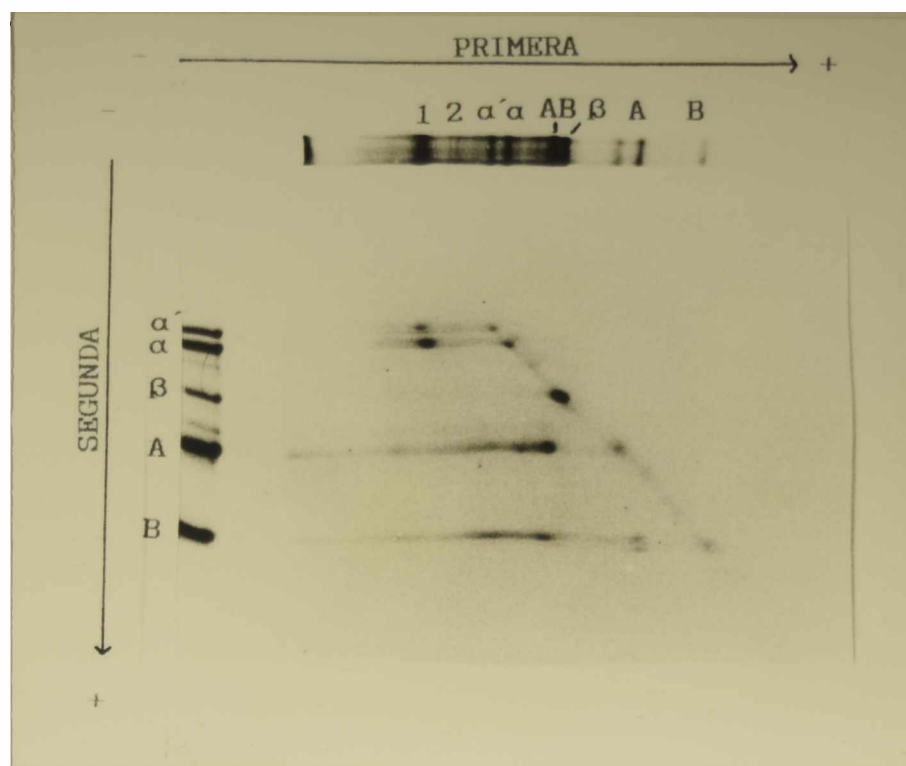


Fotografía 11: Electroforesis SDS-PAGE en gradiente lineal de poliacrilamida 5-15%, de los aislados 16, 17, 18, 19 y 20 para las calles 1, 3, 2, 4 y 5, respectivamente.

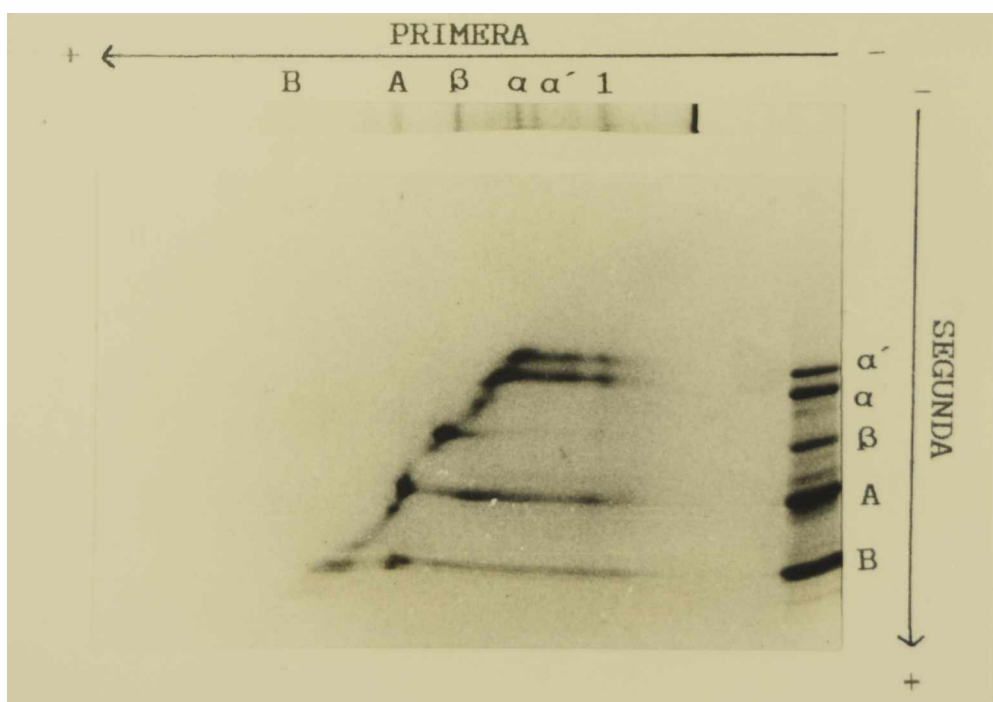


Fotografía 12: Electroforesis bidimensional (primera dimensión SDS-PAGE sin β -mercaptoetanol; segunda dimensión SDS-PAGE con β -mercaptoetanol) de un aislado tratado térmicamente a 80°C en presencia de Na_2SO_3 2% p/v (aislado 19).

También se realizaron electroforesis bidimensionales (primera dimensión SDS-PAGE sin mercaptoetanol; segunda SDS-PAGE con mercaptoetanol) de los aislados 16 y 17 (**Fotografías 13 y 14**) a fin de caracterizar los agregados que se forman durante el tratamiento térmico. Se observó que los componentes que no penetran al gel en la primera dimensión están formados por las subunidades α' y α -7S y los polipéptidos A y B-11S. Estas proteínas pueden estar formando distintos tipos de agregados cuyo peso molecular es superior a 300 Kdal ya que son incapaces de penetrar en un gel de poliacrilamida 5% y además son capaces de solubilizarse en buffer 0.1% SDS (**Fotografía 13**). El aislado 17 que presenta la subunidad intermedia AB-11S agregada, muestra en la segunda dimensión que parte del polipéptido A se encuentra formando agregados de mayor peso molecular que la subunidad β -7S (**Fotografía 14**). Los agregados incapaces de penetrar al gel de este aislado no se pudieron caracterizar, ya que en las condiciones de tratamiento del gel de la primera dimensión previo a la segunda, muchas veces estos se disuelven.



Fotografía 13: Electroforesis bidimensional (primera dimensión SDS-PAGE sin β -mercaptoetanol; segunda dimensión SDS-PAGE con β -mercaptoetanol) del aislado 16.



Fotografía 14: Electroforesis bidimensional (primera dimensión SDS-PAGE sin β -mercaptoetanol; segunda dimensión SDS-PAGE con β -mercaptoetanol) del aislado 17.

Se realizó también una caracterización por electroforesis bidimensional de otros aislados tratados térmicamente, observándose en todos los casos que los agregados que no penetran al gel están constituidos por las subunidades α' y α -7S y por los polipéptidos A y B-11S, no detectándose la presencia de la subunidad β -7S, aún en los casos en que el aislado presenta agregados β -7S/B-11S. Por lo que la subunidad β -7S permanecería insoluble, formando agregados de mayor tamaño molecular. Dichos agregados estarían estabilizados por uniones disulfuro, ya que se solubilizan en presencia de buffer SDS β -mercaptoetanol.

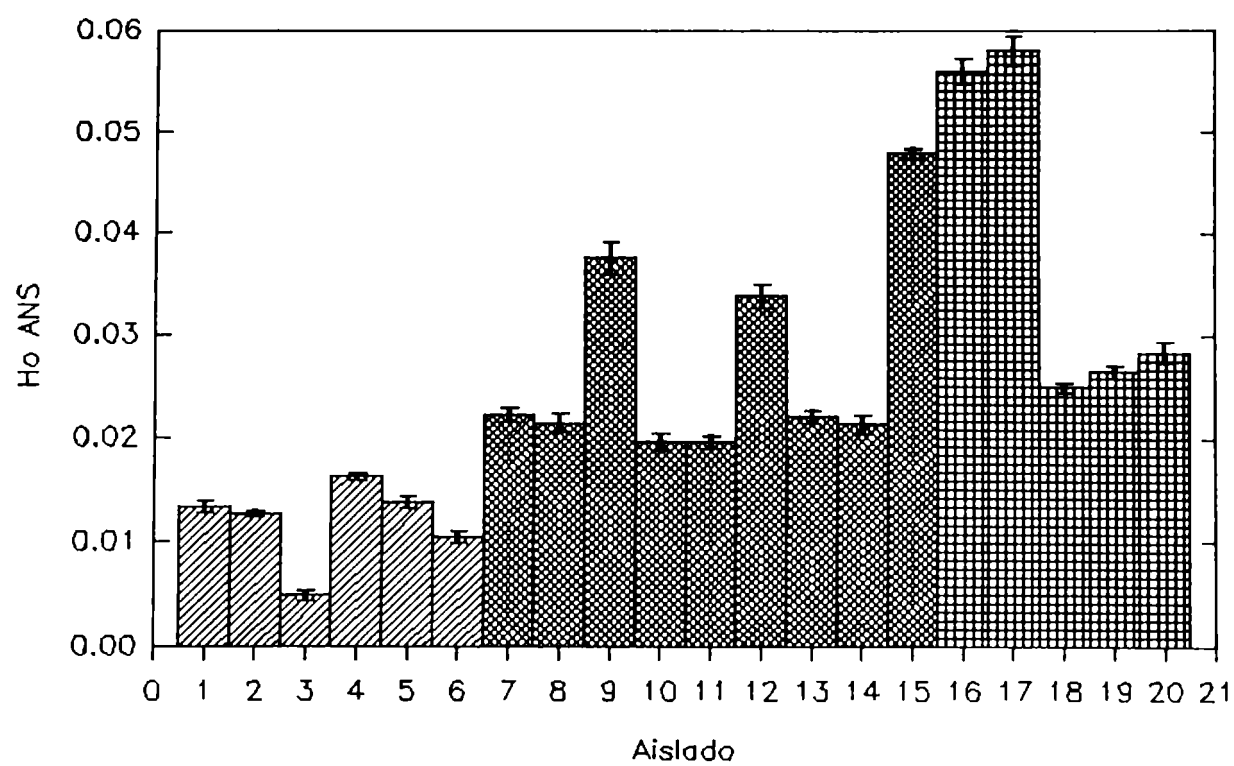
Podemos concluir que todos los aislados que sufrieron tratamiento térmico tienen agregados solubles en SDS que son sensibles a la acción del mercaptoetanol y que están formados por las subunidades α' y α de la β -conglucina y por los polipéptidos A y B de la glicina. Los aislados que sufrieron tratamientos a pH 9 o en presencia de Na_2SO_3 poseen además agregados de la subunidad β -7S y polipéptido B-11S, que son insolubles en agua y que se solubilizan en presencia de SDS- β -mercaptoetanol. Una asociación directa β -B no se ha podido probar, aunque su presencia ha sido postulada por German y col (1982) y Damodaran y Kinsella (1982), ya que al calentar glicina en presencia de β -conglucina no se produce insolubilización del polipéptido B por lo que éste se mantendría en solución por su interacción con subunidad β -7S. En nuestras condiciones de trabajo se está produciendo insolubilización por agregación a través de uniones disulfuro de ambas proteínas; aunque en una primera etapa los agregados de β y B se disuelven en SDS y no en agua por lo que las interacciones iniciales β - β ; B-B o β -B no serían de tipo disulfuro. Lo que si sugiere la existencia de una interacción β -B, aunque estos agregados no se han podido separar, es que la agregación de la subunidad β -7S solamente se produce en aquellas condiciones en la que hubo disociación de AB-11S.

1.4. Hidrofobicidad.

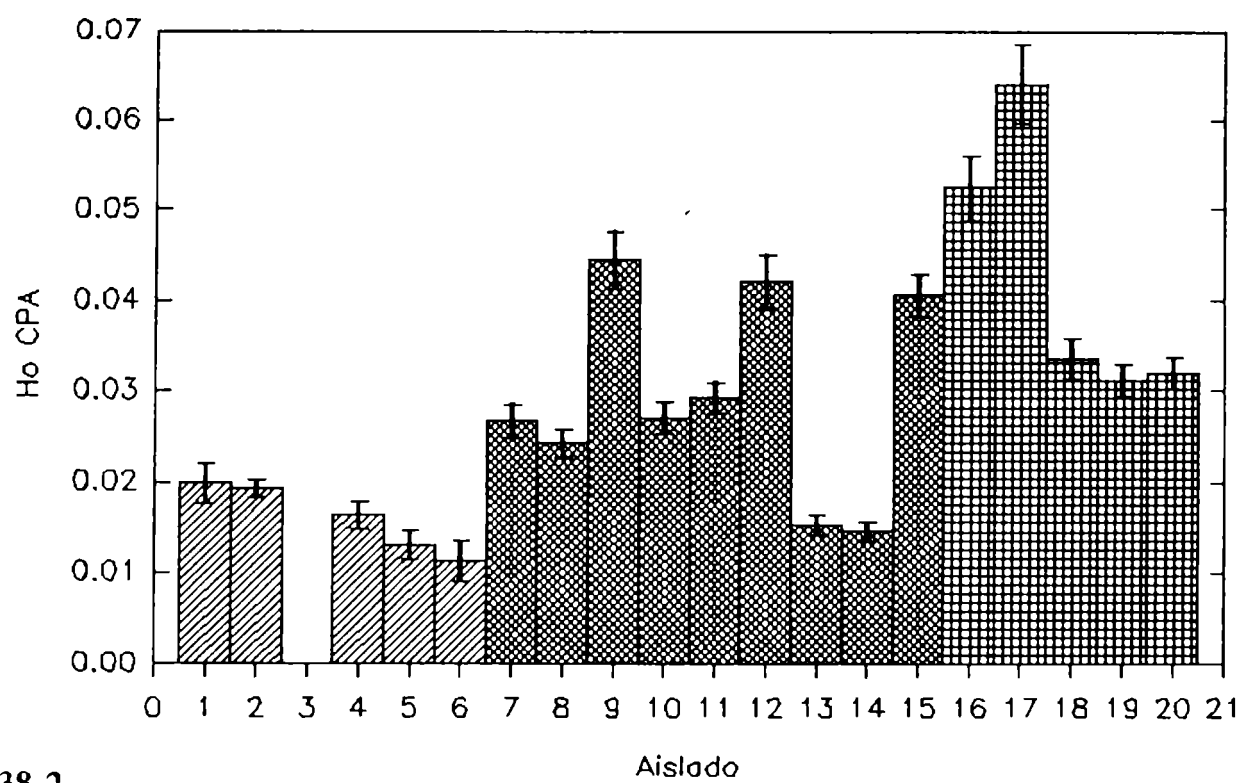
La hidrofobicidad de una proteína puede evaluarse a través de su interacción con sondas que fluorescen cuando se encuentran en un entorno no polar a través de medidas de corrimientos de la longitud de onda de máxima emisión hacia el azul, rendimientos cuánticos, constantes de afinidad y números de sitios de unión (Cardamone y Puri, 1992). Otra posibilidad es a través de la pendiente de la recta que se obtiene al graficar la intensidad de

fluorescencia relativa en función de la concentración de proteína (Kato y Nakai, 1980), dicha pendiente es función del número de sitios de unión y de la naturaleza y cantidad de grupos constituyentes de estos sitios que determinan la afinidad y la energía transferida a la sonda. La determinación de hidrofobicidad superficial (H_0) se realizó con ANS, CPA y DPH y la de hidrofobicidad total (H_T) con ANS, a fin de evaluar como afectan los tratamientos realizados a la estructura de los aislados de soja obtenidos y a su vez relacionar dichos cambios con modificaciones en la funcionalidad.

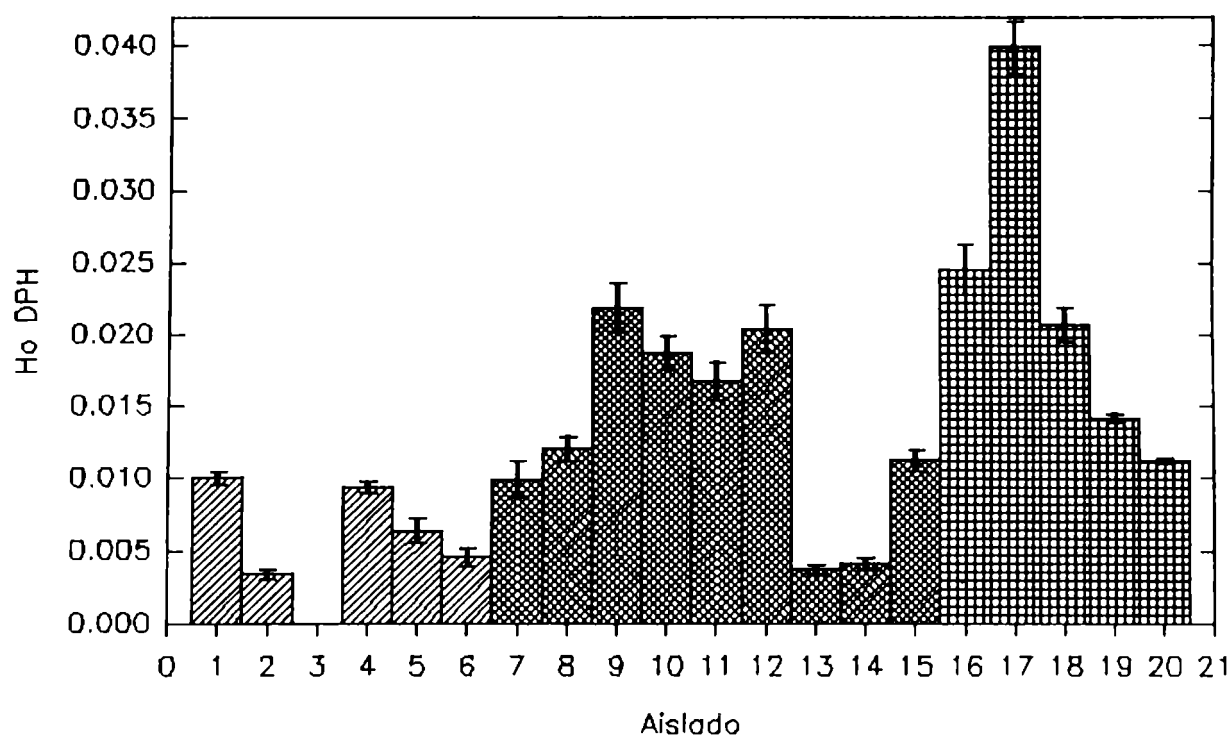
La hidrofobicidad superficial (H_0) es la pendiente inicial de las curvas que se obtienen al graficar intensidad de fluorescencia relativa en función de la concentración de proteína. Se toma la pendiente inicial ya que al aumentar la concentración de proteína comienza a existir interacción proteína-proteína que evita el pegado de la sonda. Cuando se utiliza ANS el rango de linealidad es más grande que en el caso de DPH y CPA por lo que los restos alifáticos que interactúan con estas sondas (Hayakawa y Nakai, 1985 b) serían los primeros en favorecer la interacción proteína-proteína. En la **Figura 38.1** se muestra la hidrofobicidad superficial de los aislados determinada con ANS. Las H_0 más altas corresponden a los aislados 16 y 17 que sufrieron tratamientos térmicos a 80°C y 92°C presentando el primero la globulina 11S nativa y el segundo a las globulinas 7S y 11S desnaturalizadas. Dichos tratamientos térmicos fueron cortos y la pérdida de solubilidad fue pequeña. Los aislados 3 y 6 que sufrieron tratamientos térmicos a una concentración de proteína más alta presentan menor hidrofobicidad que un aislado nativo (muestras 1 y 7) probablemente debido a que se produjo agregación e insolubilización de la proteína a través de las regiones hidrofóbicas expuestas por el tratamiento. Los aislados 9; 12 y 15 también presentan una alta hidrofobicidad ya que fueron expuestos a la acción de la urea y se encuentran desnaturalizados. Los aislados tratados con Na_2SO_3 (muestras 8; 11; 14; 18; 19 y 20) presentan hidrofobicidades del mismo orden que el nativo. No existen diferencias significativas entre los aislados que presentan mayor contenido de las globulinas 7S y 11S (muestras 10 y 13, respectivamente) y el nativo (muestra 10). Los tratamientos térmicos efectuados en presencia de Na_2SO_3 2% p/v (aislados 19 y 20) no produjeron desnaturalización ni incremento de la hidrofobicidad como el observado en las muestras control (aislados 16 y 17).



38.1



38.2

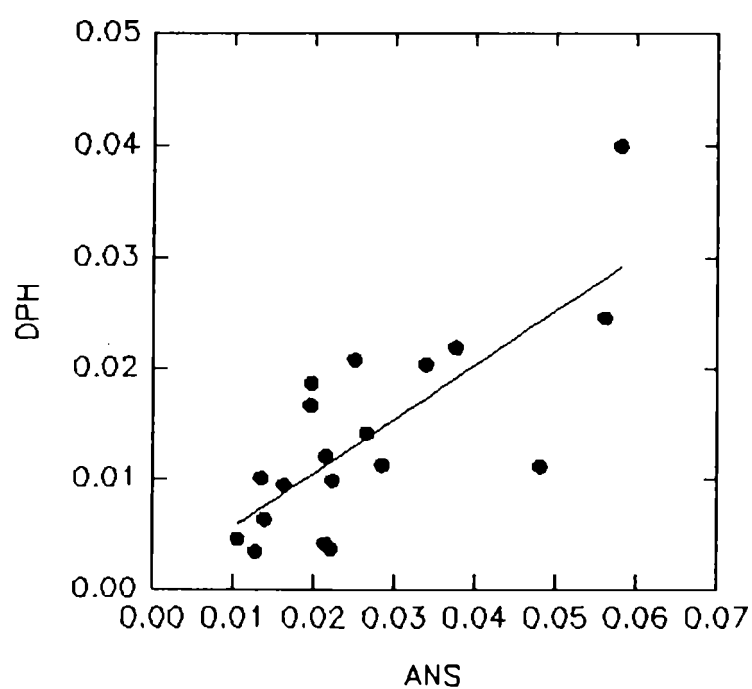
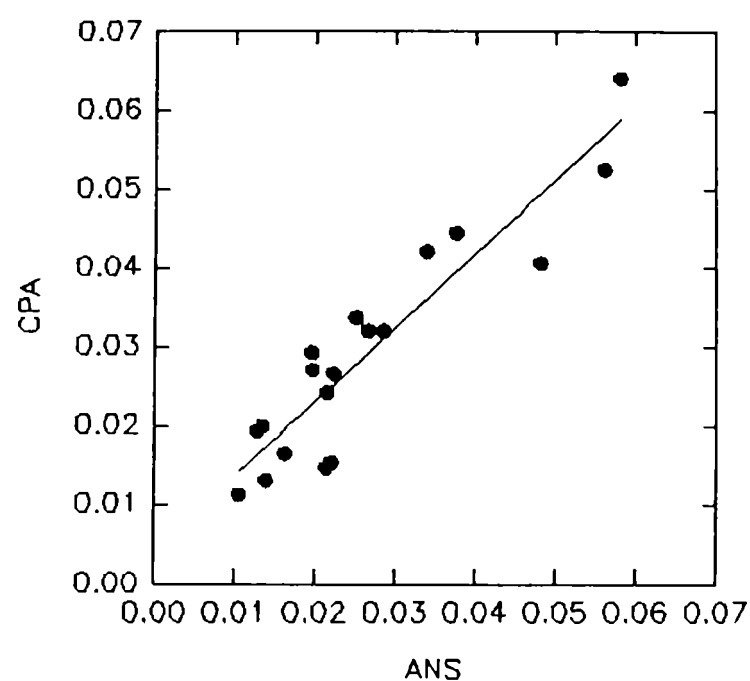


38.3

Figura 38: Valores de hidrofobicidad superficial (H_0) determinada con ANS (38.1), CPA (38.2) y DPH (38.3) de los aislados estudiados.

En la **Figura 38.2 y 38.3** se muestran las hidrofobicidades superficiales de los aislados obtenidas con CPA y DPH, respectivamente. Con CPA al igual que con ANS las muestras más hidrofóbicas son: 9; 12; 15; 16 y 17. Con DPH se observa lo mismo salvo que la muestra 15, que al igual que la 13 y 14 presenta un mayor contenido de la globulina 11S, poseen menor hidrofobicidad; mientras que los aislados que presentan mayor contenido de la fracción 7S (muestras 10-11) son más hidrofóbicos que un aislado normal (muestras 7 y 8). También los aislados 19 y 20 que fueron tratados térmicamente en presencia de Na_2SO_3 muestran menor hidrofobicidad superficial con DPH que la determinada con ANS o CPA. Los aislados enriquecidos en la globulina 7S presentan aumentada la hidrofobicidad alifática en relación a un aislado nativo ya que los valores de H_0 son superiores tanto cuando se utiliza CPA como DPH. En cambio los aislados más ricos en 11S muestran menor H_0 con DPH y CPA e igual H_0 con ANS que la correspondiente al aislado nativo, por lo que pueden tener disminuida la hidrofobicidad alifática.

En la **Figura 39** se muestra la relación existente entre las hidrofobicidades superficiales determinadas con ANS, CPA y DPH de los aislados. La mejor correlación se observa entre las hidrofobicidades superficiales determinadas con ANS y CPA ($r=0.852$), en relación a las determinadas entre DPH y CPA ($r=0.820$) o DPH y ANS ($r=0.606$).



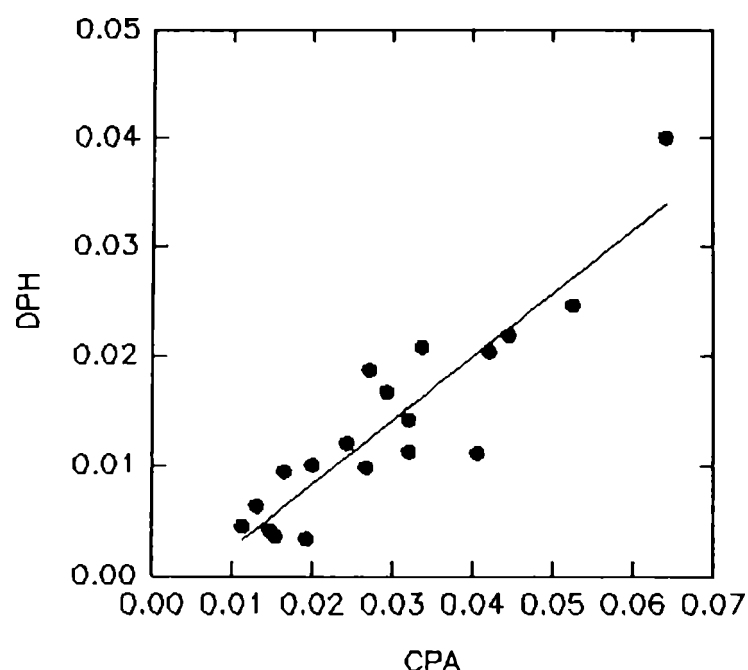


Figura 39: Relación entre las hidrofobicidades superficiales de los aislados determinadas con diferentes sondas.

Por lo expuesto podemos decir que los valores de H_0 , determinados por ANS, CPA o DPH, más altos corresponden a los aislados desnaturalizados por calor o con urea que no sufrieron pérdida de solubilidad. Además el hecho de que presenten estos valores de hidrofobicidad indica cierto grado de recuperación de estructura ya que la sonda requiere de un entorno hidrofóbico para fluorescer (Damodaran, 1986 y 1987 y Damodaran y Song, 1988). Se realizaron también medidas de las constantes de disociación de los complejos sonda-proteína de algunos de los aislados (muestras 1; 7; 9; 16 y 17) no observándose diferencias significativas entre las mismas. Las constantes de disociación son del orden de $30\mu\text{M}$. Por lo que las modificaciones producidas por el tratamiento afecta fundamentalmente al número de sitios de unión, aunque dada la complejidad del sistema es difícil utilizar estos parámetros como una característica del aislado.

Se evaluó también la hidrofobicidad total (H_T) (también conocida como hidrofobicidad expuesta o S_e) de los aislados desnaturalizados por tratamiento térmico en presencia de SDS para evitar la agregación. La determinación se realizó con ANS en presencia de SDS. Se observó una disminución de la afinidad de la sonda por la proteína en presencia del SDS (K_d $80\mu\text{M}$). No se detectaron cambios en la hidrofobicidad total por los tratamientos realizados

ni por modificaciones en el contenido de las fracciones 7S y 11S, salvo en el caso de los aislados 3 y 6 que presentan disminuida la hidrofobicidad total ya que la mayor parte de los componentes proteicos son insolubles.

2. Propiedades funcionales.

2.1. Solubilidad.

En la **Figura 40** se muestran los valores de solubilidad en agua de los aislados estudiados. Se observa que los tratamientos térmicos a 98°C producen una pérdida muy importante de la misma. Esta disminución está de acuerdo con el grado de agregación detectado por electroforesis y la disminución de hidrofobicidad ya que estas regiones promoverían la agregación.

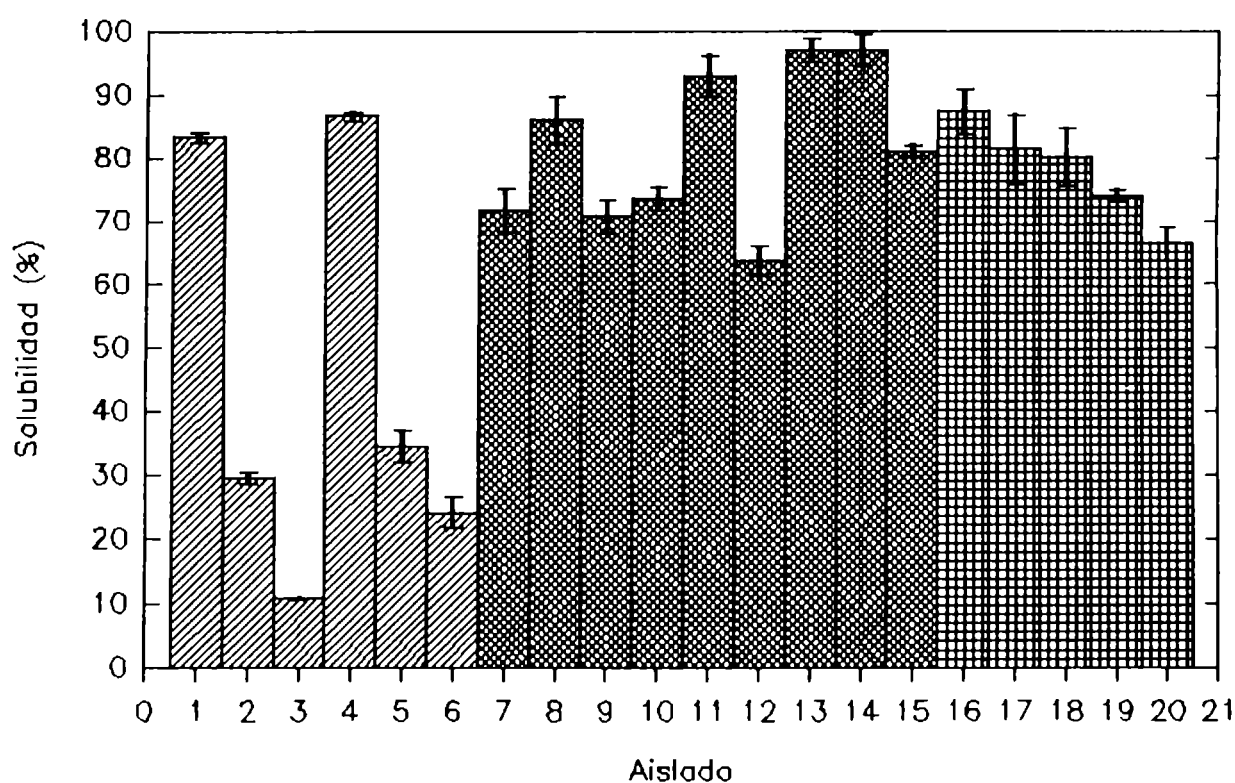


Figura 40: Solubilidad porcentual en agua de los aislados estudiados.

Los tratamientos efectuados a 80°C y 92°C debido a su corta duración prácticamente no modifican la solubilidad de los aislados 16 y 17, aunque fueron suficientes para aumentar la hidrofobicidad superficial. La agregación intensa, a través de uniones disulfuro, como la que presentan los aislados tratados a 98°C requiere de un mayor aporte energético que el que se suministró en este caso.

Los tratamientos térmicos a pH 9 provocan reacciones de disociación además de agregación, responsables de la mayor solubilidad detectada en los aislados 5 y 6 con respecto a aquellos tratados térmicamente a pH 7 (aislados 2 y 3).

El efecto del tratamiento reductor con Na₂SO₃ en la solubilidad es más variable ya que en algunos aislados se produce un aumento (muestras 8; 11 y 18) mientras que en otros se produce una disminución de la misma (muestras 19 y 20). Sin embargo estas modificaciones son pequeñas.

Por su parte los tratamientos con Na₂SO₃ y urea (muestras 9; 12 y 15) producen un decaimiento en la solubilidad con respecto a los aislados sin tratar o los tratados únicamente con el agente reductor. Se observa además que el aislado más rico en la globulina IIS es más soluble en agua que un aislado de composición normal.

2.2. Capacidad de retención de agua.

La mayor capacidad de retención de agua (WHC) corresponde a la de los aislados 2; 3; 5 y 6 siendo de 20.5; 22.6; 30.7 y 23.4 ml H₂O/g de aislado, respectivamente. Estas muestras sufrieron un tratamiento térmico a alta concentración proteica por lo que poseen un mayor grado de agregación y menor solubilidad. Se observó también que el medio alcalino (pH 9) favorece la WHC, en tanto que el incremento del tiempo de tratamiento a este pH produce una disminución de la misma concordante con el mayor grado de disociación observado por electroforesis (aislados 5 y 6, **Figura 41**). El resto de los aislados tienen una baja capacidad de retención de agua pues son muy solubles.

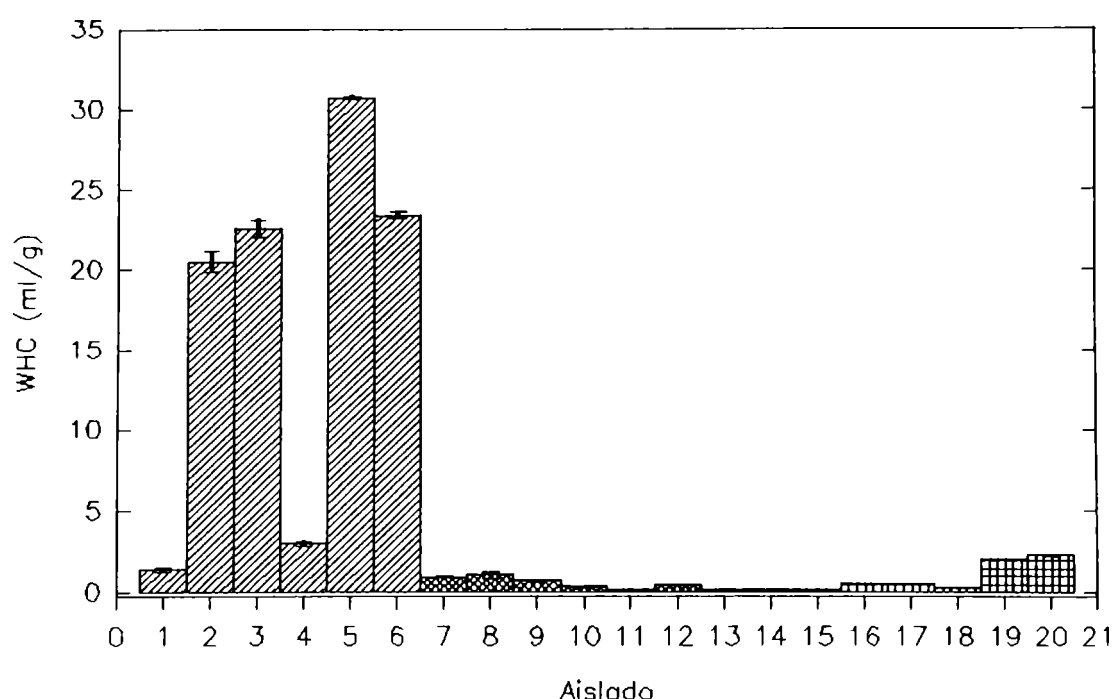


Figura 41: Capacidad de retención de agua de los aislados estudiados.

2.3. Viscosidad.

La determinación de la viscosidad mostró valores altos sólo en el caso de los aislados 2; 3; 5 y 6 siendo esta de 125; 94; 146 y 179 mPa, respectivamente (**Figura 42**). Estos valores de viscosidad correlacionan con la elevada capacidad de retener agua mostrada por los aislados. Las muestras que sufrieron tratamientos térmicos cortos a baja concentración de proteína (16 y 17), tienen una elevada hidrofobicidad superficial lo que puede incrementar la interacción entre partículas disueltas provocando un incremento en la viscosidad. En el caso del aislado 17 se observó por electroforesis la presencia de agregados de la subunidad intermedia AB que también podría inducir un aumento en la viscosidad. La falta de incremento en la viscosidad de estos aislados puede atribuirse a su elevada hidrofobicidad que dificulta su hidratación y aumento del volumen hidrodinámico, por lo que estos aislados tendrían una baja capacidad de embeber agua. Los aislados 19 y 20 recibieron el mismo tratamiento térmico que los aislados 16 y 17, pero en presencia de Na_2SO_3 2% p/v, que estabiliza a la glicinina frente a la desnaturalización térmica. Poseen una viscosidad superior que no puede ser atribuida únicamente a la sulfonación, ya que el aislado 18 presenta una

sulfonación similar. Estos cambios en la viscosidad correlacionan con su menor solubilidad y mayor capacidad de retención de agua en comparación con los aislados 16-18.

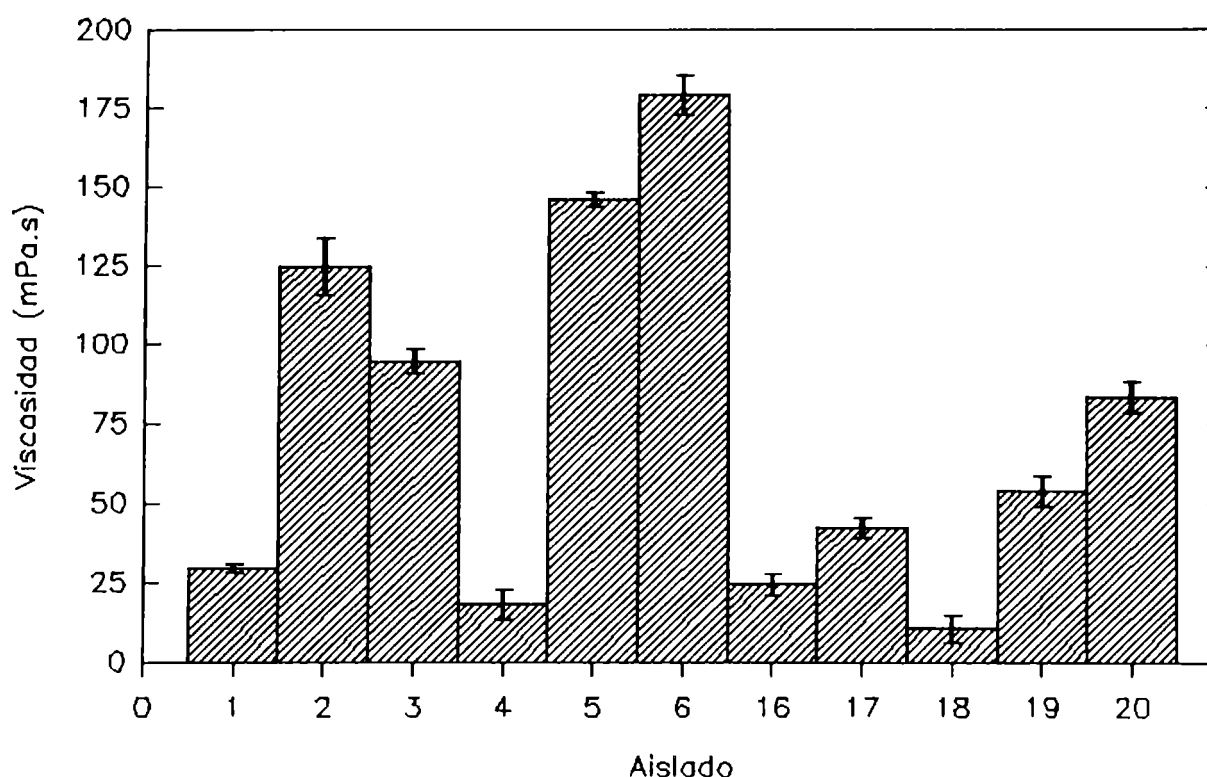


Figura 42: Viscosidad aparente a 128 rpm y 20°C de los aislados estudiados (la viscosidad de los aislados 7-15 no fue determinada).

2.4. Propiedades emulsionantes.

Las propiedades emulsionantes de los aislados obtenidos fueron evaluadas a través de la medición del índice de actividad emulsionante (IAE) acorde al método de Pearce y Kinsella (1978). Además se determinó la tendencia de las emulsiones formadas a desestabilizarse por floculación-cremado y coalescencia.

2.4.1. Actividad emulsionante.

La **Figura 43** muestra los valores de IAE determinados para los distintos aislados. Los resultados obtenidos indican que la actividad emulsionante se ve favorecida por el incremento

de pH a 9 (muestra 4), por la desnaturalización de la fracción 7S (muestra 16) y por tratamientos desnaturalizantes y reductores que sufre un aislado enriquecido en la fracción 7S (muestra 12). Las muestras 2 ;3; 5 y 6 tienen un IAE bajo debido a que son muy insolubles. Por lo tanto los tratamientos que mejoran la actividad emulsionante son el incremento del pH a 9, el cual puede producir por ejemplo disociación de oligómeros, dichas modificaciones deben conservarse ya que la determinación se realiza en todos los casos con el mismo buffer. También se ve favorecida por la desnaturalización de la fracción de 7S y por los tratamientos desnaturalizantes y reductores que sufre un aislado más rico en 7S. Dado que el método de evaluación empleado bloquea a la emulsión en una etapa inicial de formación por el agregado de una solución estabilizante se evalúa fundamentalmente la velocidad de adsorción, por lo que estos aislados se caracterizan por tener una mayor velocidad de adsorción a la interfase. En el caso del aislado 16 la misma puede atribuirse a su mayor hidrofobicidad superficial. También deben considerarse modificaciones en la velocidad de adsorción por variación del peso molecular medio de los distintos componentes del aislado, pero un factor que es determinante es el estado de la globulina 7S, ya que los aislados 9 y 15 no presentan este efecto. En el caso del aislado 15 este comportamiento puede atribuirse a su menor solubilidad. Está descrito que aislados con mayor contenido de la globulina 7S son mejores agentes emulsionantes (German y col 1985 y Yao y col 1990).

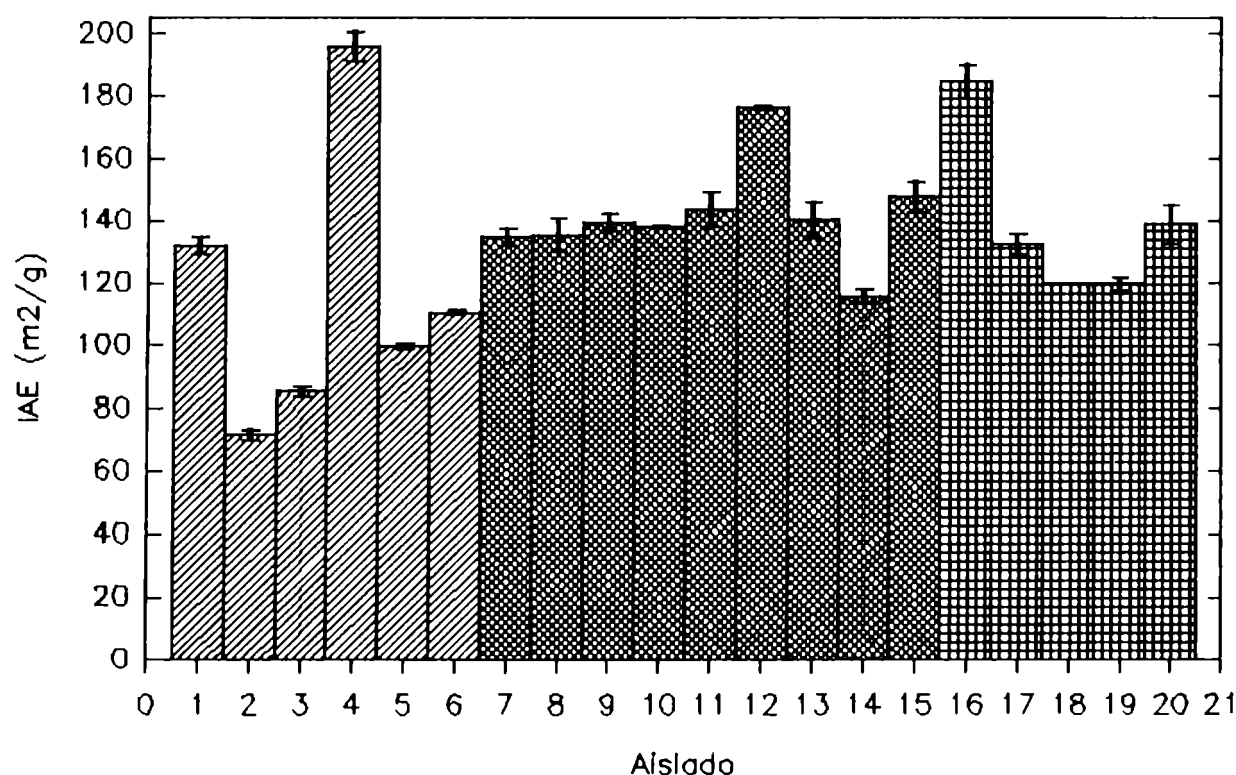
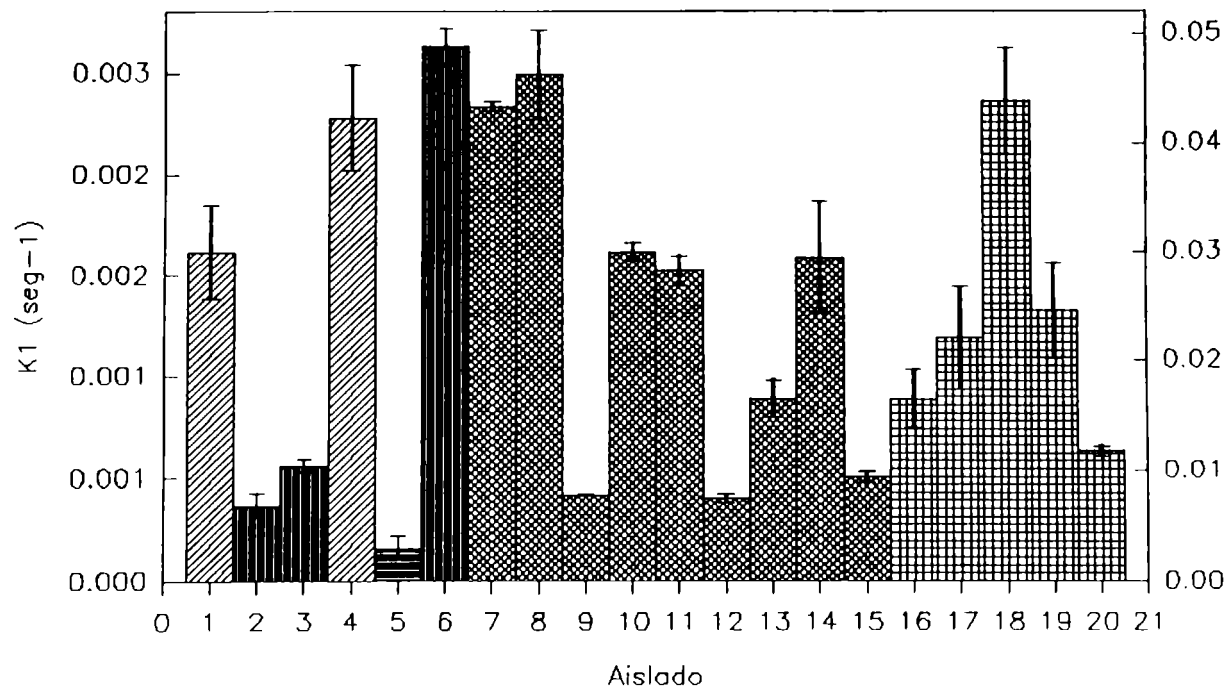


Figura 43: Índice de actividad emulsionante (IAE m²/g) de los aislados estudiados.

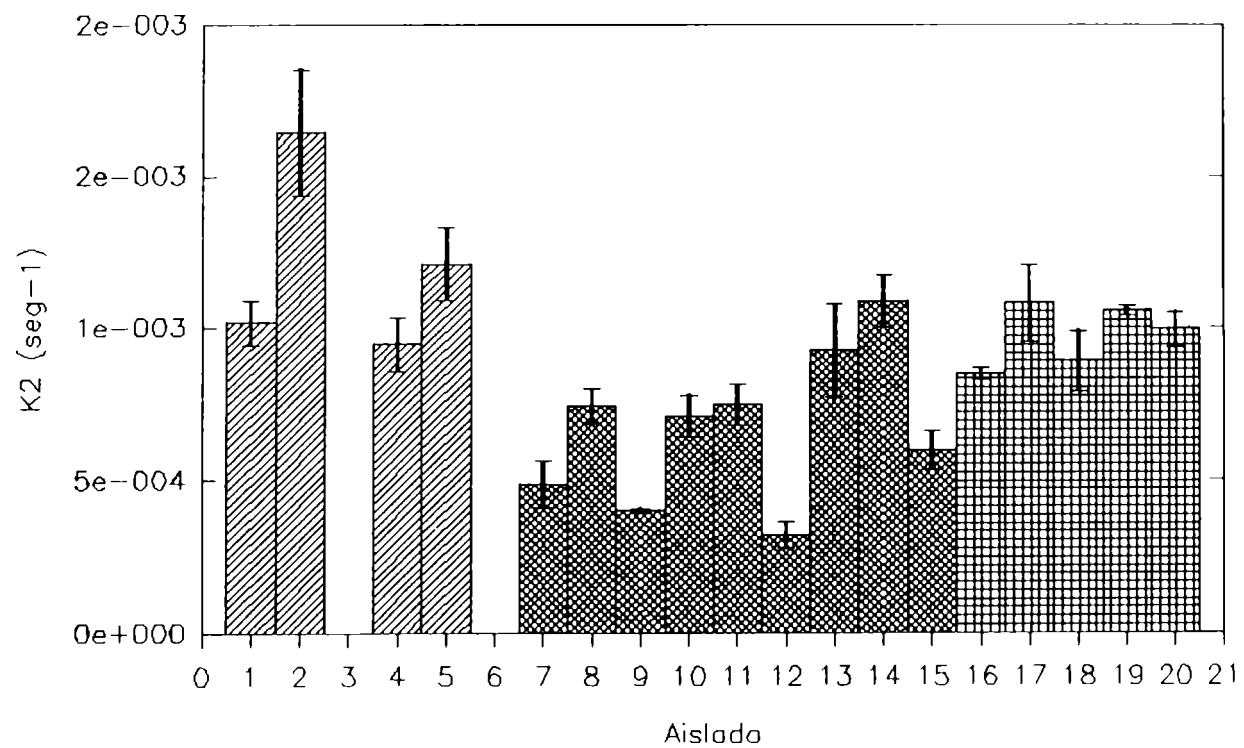
2.4.2. Estabilidad de las emulsiones.

2.4.2.1. Desestabilización por floculación y cremado.

La desestabilización por floculación y cremado de las distintas muestras se evaluó midiendo el incremento de volumen de la fase crema en función del tiempo luego de preparar una emulsión lo suficientemente inestable para que la separación de dos fases, una enriquecida en aceite y la otra en agua, ocurra rápidamente. La misma se evaluó a través de dos constantes de desestabilización: la primera corresponde a los primeros 500 segundos y la segunda al período comprendido entre 500-2500 segundos. La **Figura 44** muestra dichas constantes de velocidad: k_1 (44.1) y k_2 (44.2) para los aislados estudiados. La separación de las fases en los aislados 3 y 6 es prácticamente instantánea. Los aislados más estables de acuerdo a los valores de las constantes de velocidad son el 9; 12 y 15. Estos aislados están completamente desnaturalizados y presentan a la glicinina disociada en los polipéptidos A y B. El hecho de que estos aislados, cuyos componentes poseen un peso molecular promedio inferior al de los otros aislados, formen emulsiones más estables llama la atención ya que en general se afirma que proteínas de bajo peso molecular son capaces de adsorberse más rápidamente a la superficie pero son incapaces de formar emulsiones estables ya que no forman films lo suficientemente rígidos o estructuras tipo red capaces de resistir fuerzas de deformación. La mayor velocidad de difusión que pueden tener proteínas de menor peso molecular no es un factor crítico para que tengan actividad superficial ya que durante la etapa de homogeneización se facilita su incorporación a la interfase (Halling 1981; Phillips 1981; Damodaran 1989). Por lo que estos aislados no sólo son capaces de adsorberse rápidamente sino que también forman un film que demora la floculación tal vez por una mayor repulsión electrostática.



44.1 (◆)

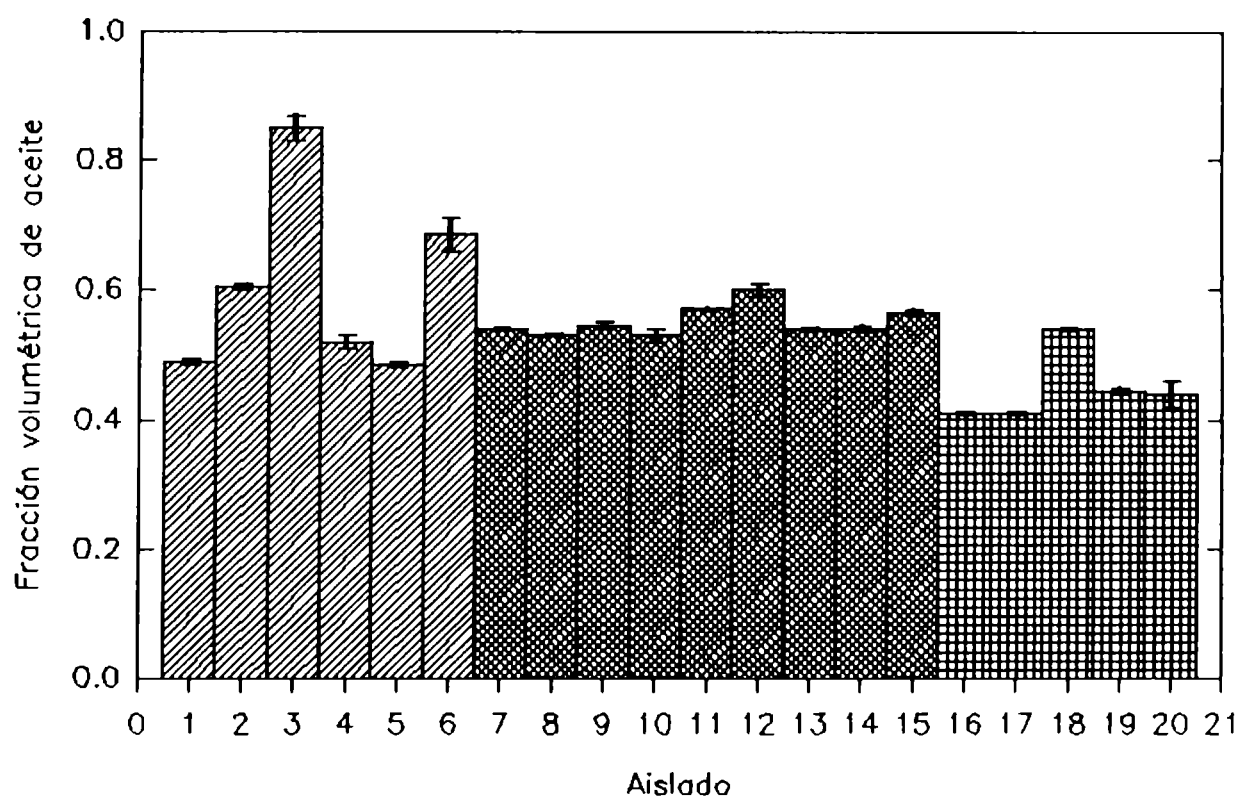


44.2

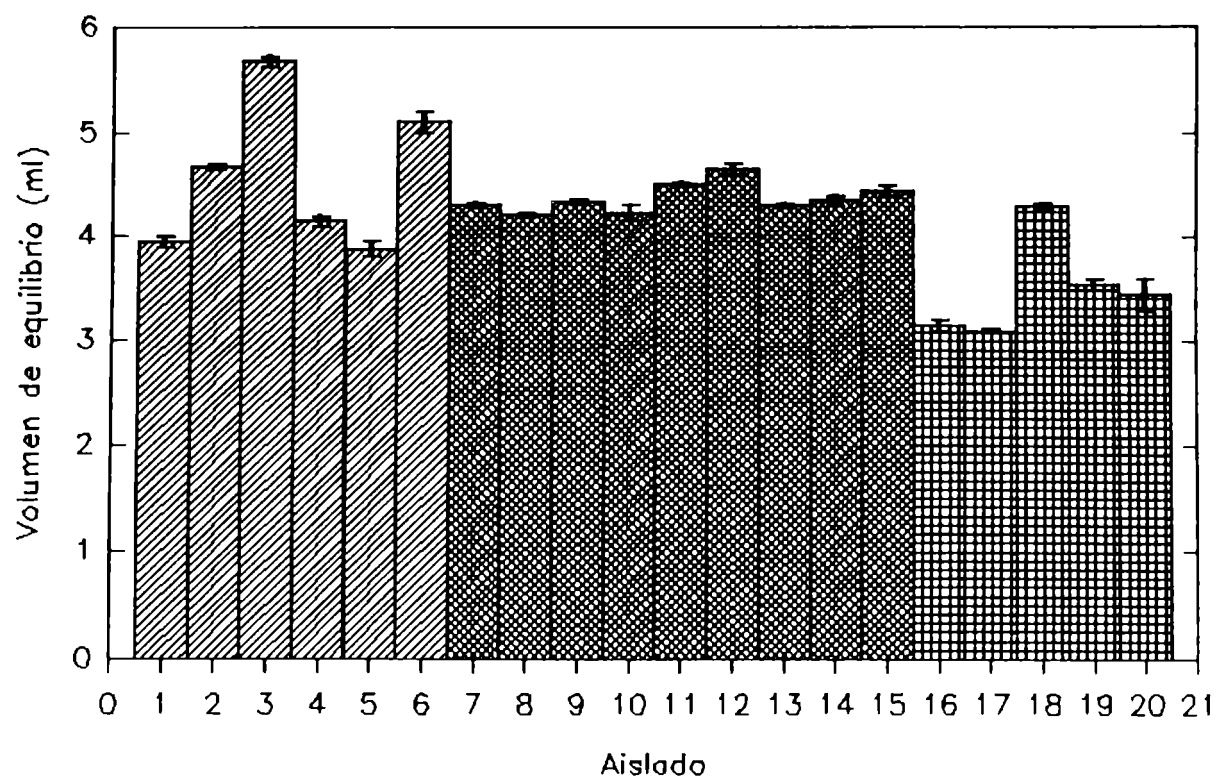
Figura 44: Constantes de velocidad de desestabilización por floculación y cremado correspondiente a los primeros 500 segundos: k_1 (44.1) y al período entre 500-2500 segundos: k_2 (44.2) de los aislados estudiados.

◆ Las series en negro corresponden al eje derecho.

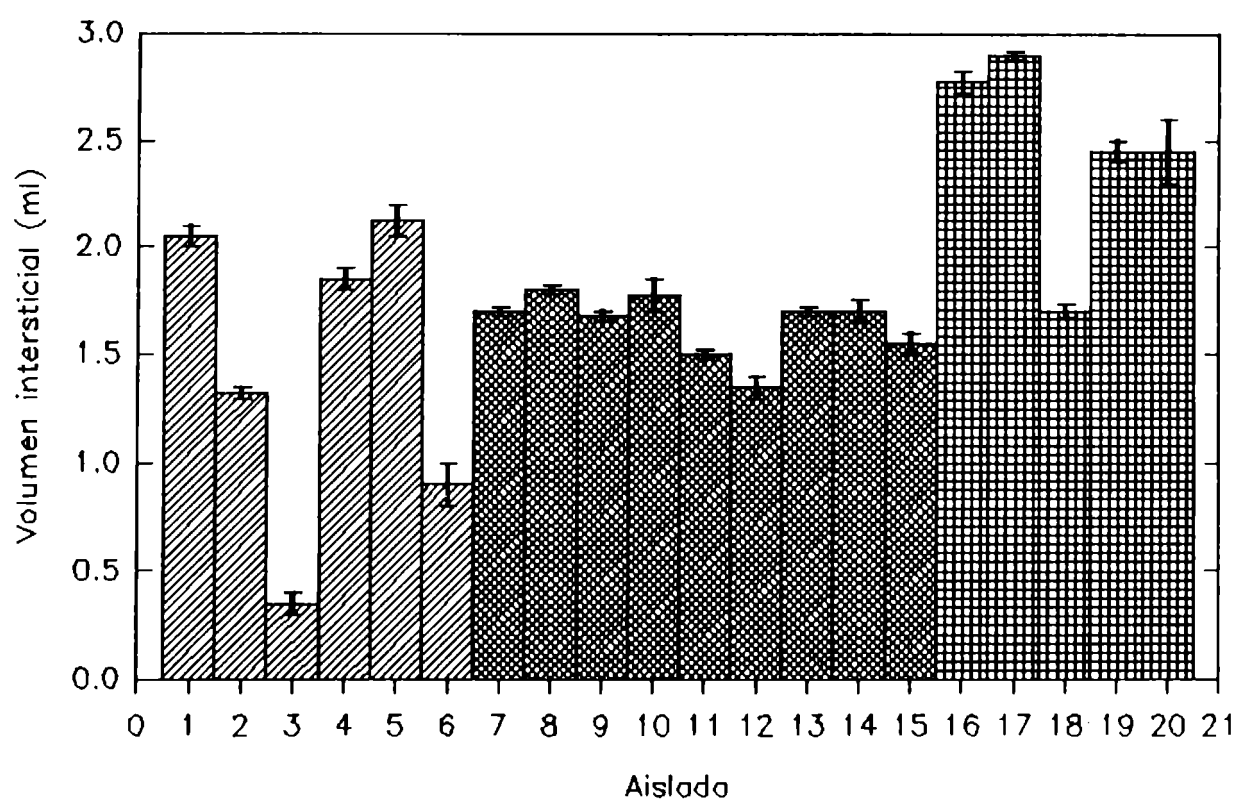
Se tomaron además los valores de equilibrio (24 horas), luego de realizadas las determinaciones de floculación y cremado como una medida de la actividad emulsionante. La **Figura 45** muestra la fracción volumétrica de aceite en el equilibrio (ϕ) (45.1), el volumen de fase acuosa en el equilibrio (V_e) (45.2) y el volumen intersticial de agua en la fase crema (V_i) (45.3). La muestra 3 es tan inestable que sufre coalescencia. Las muestras 16 y 17 presentan los mejores valores de ϕ y V_i , aunque sus valores de k_1 y k_2 son intermedios si se los compara con los valores de los otros aislados, lo que indica que estas muestras presentan una desestabilización inicial más rápida que los aislados 9, 12 y 15, que con el tiempo se hace más lenta, ya que exhiben los mejores valores de equilibrio. El aislado 16 no sólo se caracteriza por su capacidad estabilizante, sino que también se destaca en su actividad emulsionante. El aislado 4, que se caracteriza por un IAE elevado, muestra valores de ϕ y V_i dentro del mismo rango que la mayor parte de los aislados.



45.1



45.2



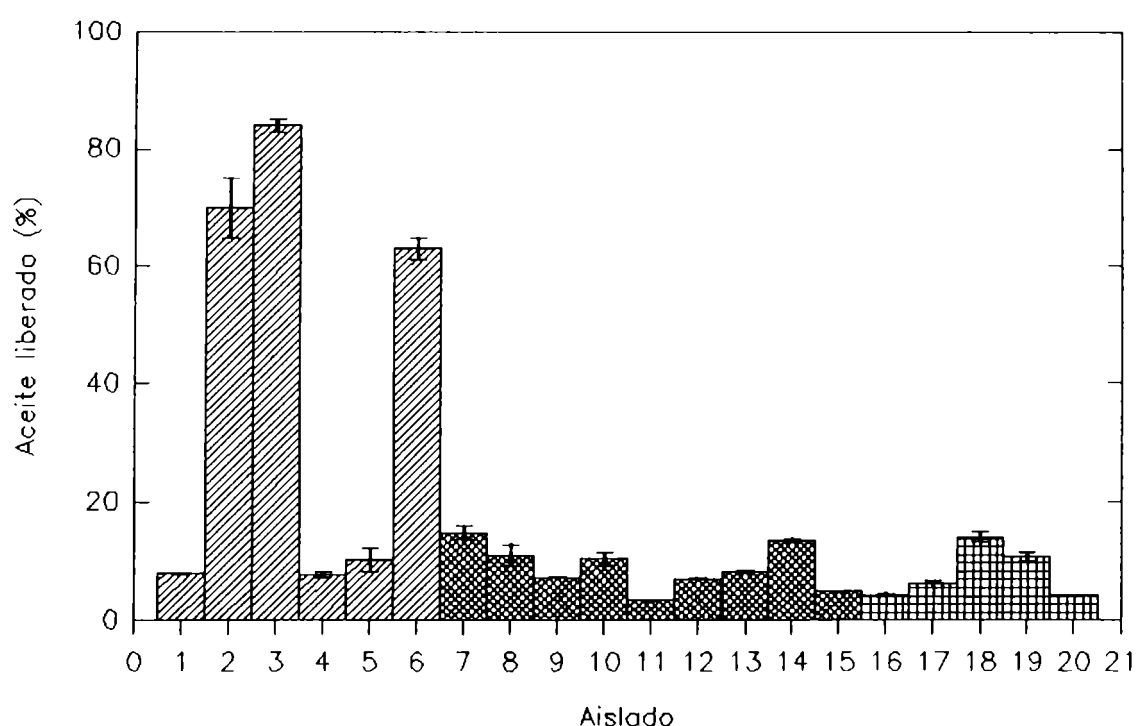
45.3

Figura 45: Fracción volumétrica de aceite (ϕ) (45.1); volumen de fase acuosa (V_e) (45.2) y volumen intersticial de agua en la fase crema (V_i) (45.3) en el equilibrio de los distintos aislados.

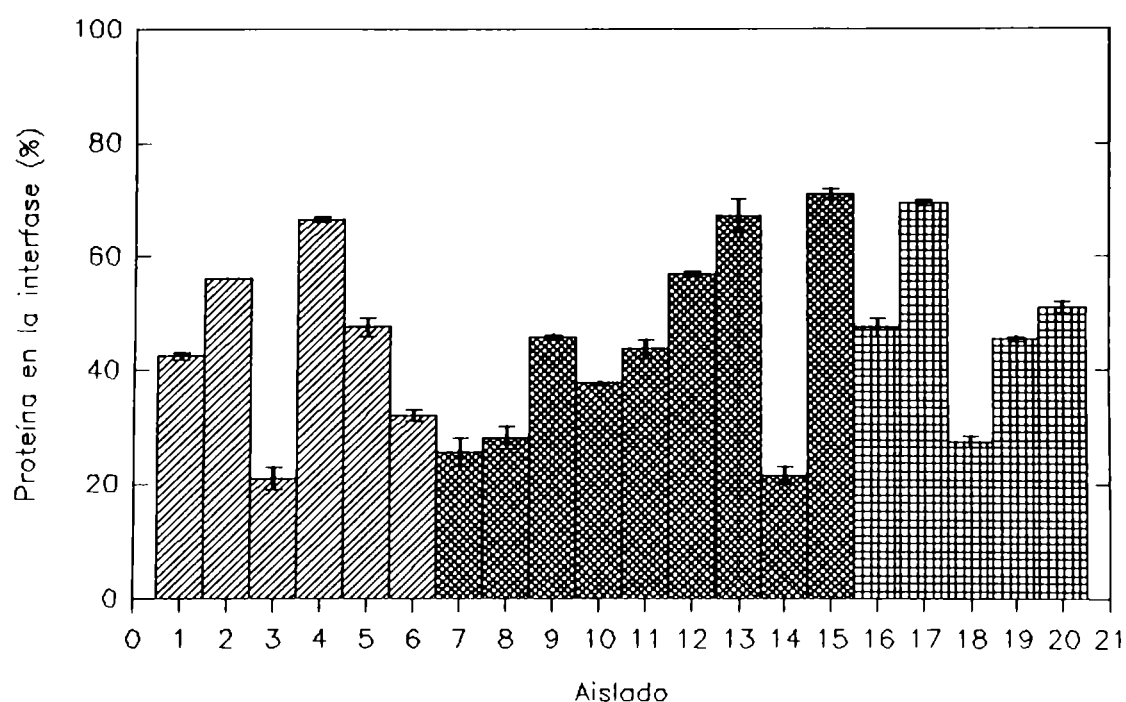
2.4.2.2. Desestabilización por coalescencia.

La **Figura 46** presenta la desestabilización producida por coalescencia (46.1) y la proteína retenida (46.2) en la interfase. Las muestras más insolubles (2; 3 y 6) muestran una coalescencia superior al 60%. El resto de los aislados presenta una coalescencia inferior al 20%. Con excepción del aislado 16 se observa una tendencia que muestra una menor desestabilización por coalescencia a medida que aumenta la cantidad de proteína retenida en la interfase. Los aislados con menor oiling off son el 11, 15, 16 y 20 lo que indica la formación de films más fuertes.

El análisis efectuado por electroforesis de la proteína presente en la fase acuosa luego de la coalescencia, muestra en el caso de los aislados 9; 12 y 15 una elevada proporción del polipéptido A en relación al resto de los componentes, por lo que el mismo no migraría a la interfase. El resto de los aislados presenta perfiles similares a los observados al solubilizar con un buffer fosfato, salvo el polipéptido B que prácticamente no aparece en ningún perfil. Por lo tanto, con excepción del polipéptido B, no se puede hablar de una migración preferencial a la interfase de algún componente.



46.1



46.2

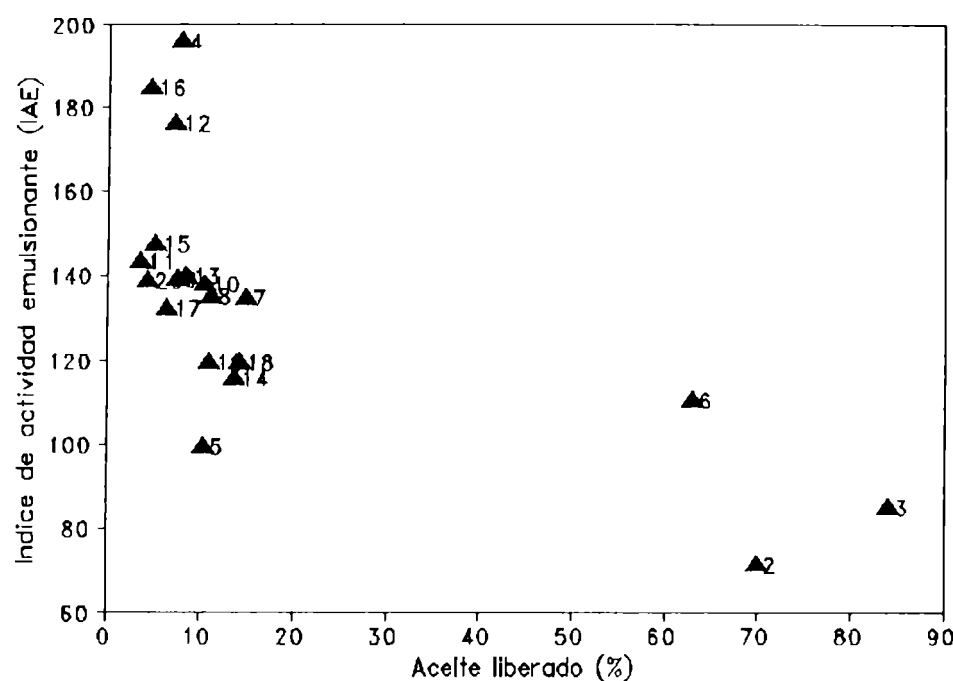
Figura 46: Porcentaje de aceite liberado por coalescencia (46.1) y porcentaje de proteína retenida en la interfase (46.2) correspondiente a los aislados estudiados.

De acuerdo con los resultados obtenidos por los tres métodos empleados las muestras 2; 3 y 6 carecen de capacidad de formar y estabilizar emulsiones. Esto está de acuerdo con su baja solubilidad, destacándose por sus propiedades emulsionantes el aislado a pH 9, los aislado reducidos con sulfito y urea y los aislados que sufrieron tratamientos térmicos suaves. Los resultados discutidos indican que los tratamientos efectuados afectan de manera diferencial las distintas características requeridas para formar emulsiones tales como la velocidad de adsorción y la capacidad de formar un film estable.

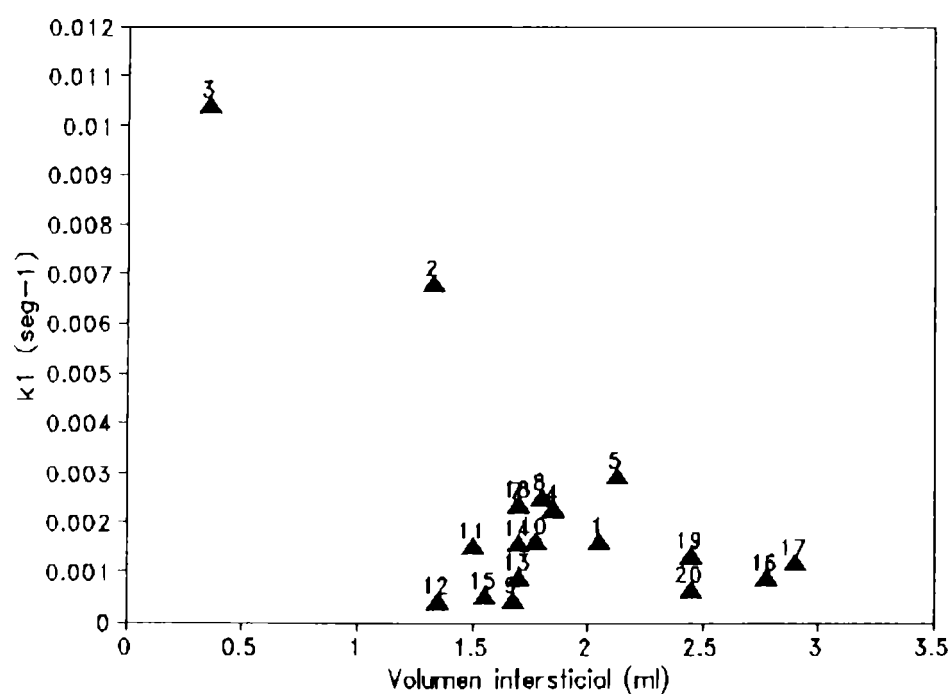
2.4.3. Relación entre los distintos métodos utilizados para evaluar las propiedades emulsionantes.

Se realizaron comparaciones entre los valores de actividad emulsionante, determinada por el método de Pearce y Kinsella (1978), y las medidas de estabilidad. La **Figura 47** muestra los valores obtenidos. Se puede observar que a mayor IAE mayor es el volumen intersticial de agua en la fase crema y menor el volumen de aceite liberado por coalescencia (**Figura**

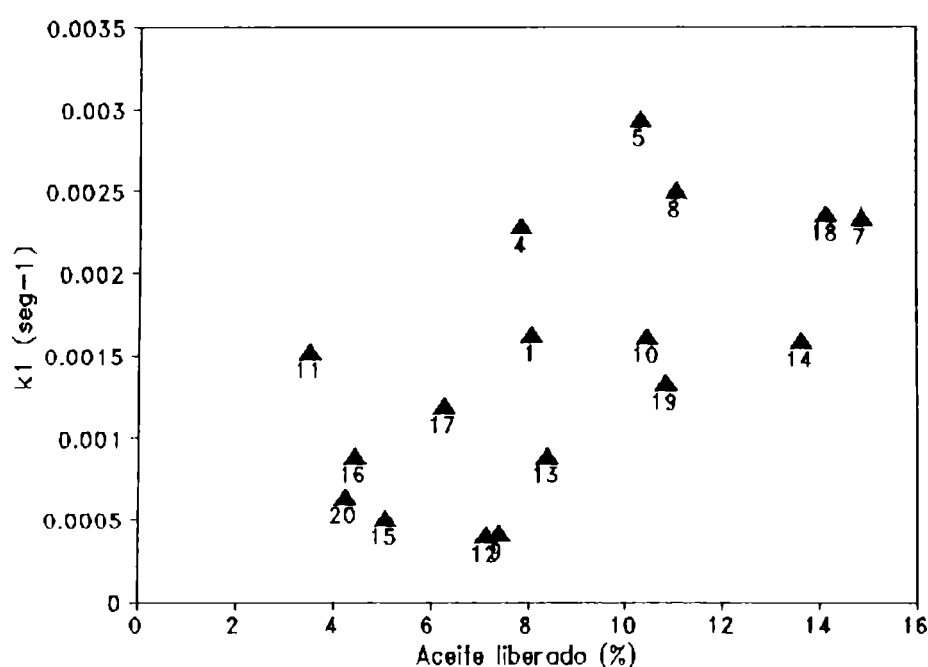
47.1). Durante la desestabilización de una emulsión por floculación y cremado se observa una primera etapa de desestabilización rápida y una fase de equilibrio. En la **Figura 47.2** se muestra la relación entre k_1 y V_i , se puede observar que con excepción de las muestras 9; 12 y 15, aquellos aislados que poseen una menor k_1 presentan un mayor V_i . Estas muestras se caracterizan por poseer alta hidrofobicidad y presentar a la globulina 11S disociada en los polipéptidos A y B. La **Figura 47.3** muestra la relación existente entre la constante de velocidad k_1 del proceso de floculación y cremado y la desestabilización por coalescencia, en la misma no se presentan los aislados más inestables. Se observa la misma tendencia general para ambos mecanismos de desestabilización.



47.1



47.2



47.3

Figura 47: Relación entre el índice de actividad emulsionante (IAE) y el porcentaje de aceite liberado por coalescencia (47.1); relación entre la constante de velocidad de desestabilización por floculación y cremado (k_1) y el volumen intersticial de agua en la fase crema (V_i) (47.2) y relación entre la constante de desestabilización (k_1) y el porcentaje de aceite liberado por coalescencia (47.3) para los distintos aislados.

La **Figura 48** muestra la relación existente entre los distintos métodos utilizados para caracterizar las propiedades emulsionantes, los tres métodos muestran las mismas tendencias, el máximo que se observa corresponde a los valores de índice de actividad emulsionante, constante de velocidad de desestabilización por floculación y cremado (k_1) y oiling off de máxima inestabilidad.

La dispersión que se observa al intentar hacer una correlación entre los mismos demuestra la necesidad del empleo de más de un método de medida para la caracterización de las propiedades emulsionantes de un aislado. También muestra que los tratamientos realizados afectan tanto la capacidad de formar como de estabilizar emulsiones no siempre en el mismo sentido.

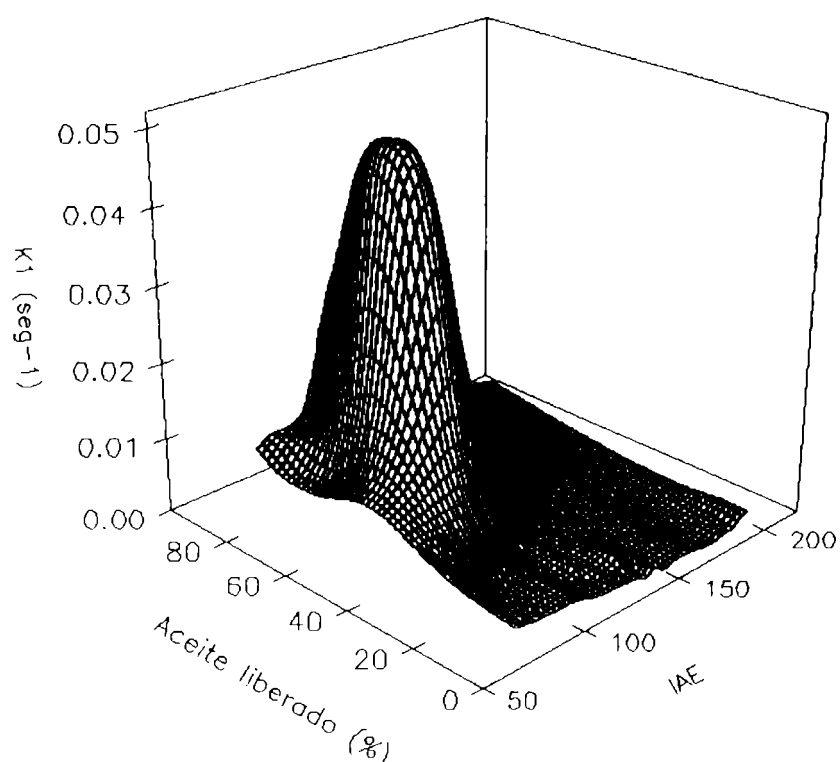


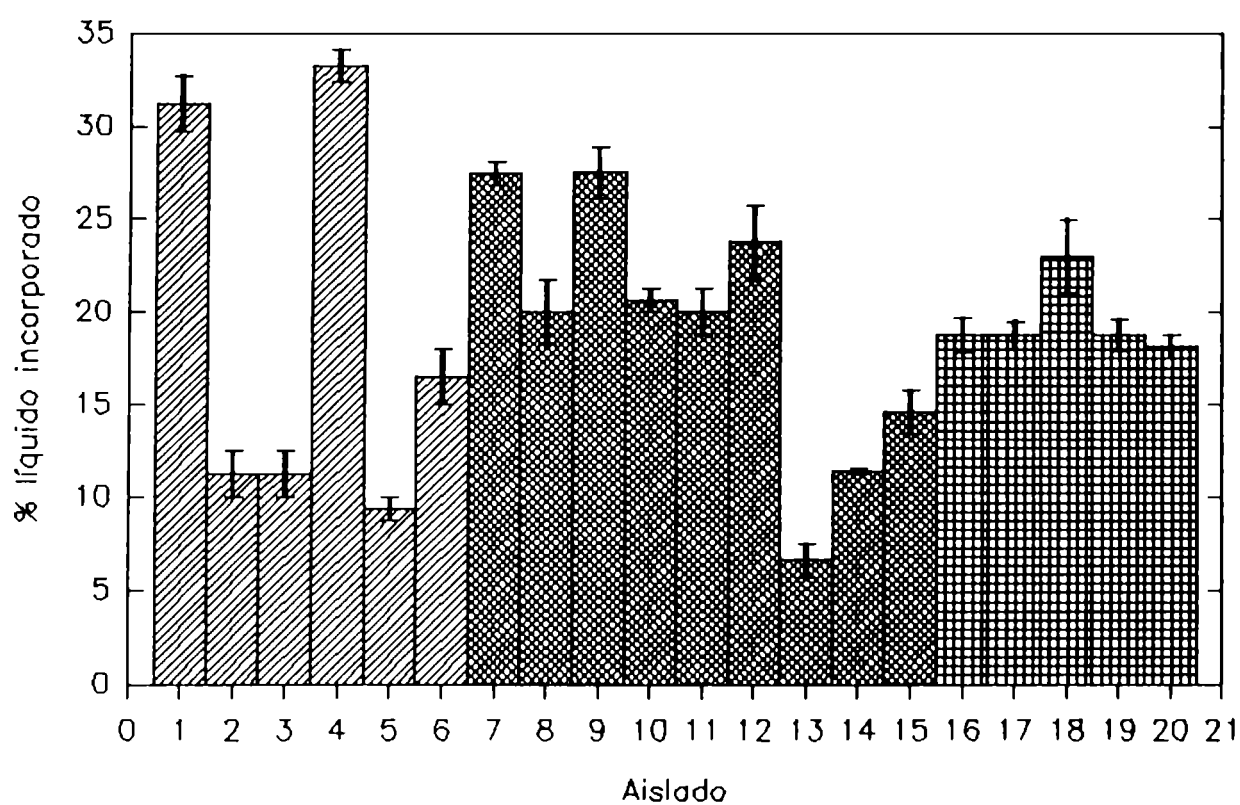
Figura 48: Relación entre el índice de actividad emulsionante (IAE), la constante de velocidad de desestabilización por floculación y cremado (k_1) y el porcentaje de aceite liberado por coalescencia para los aislados estudiados.

2.5. Propiedades espumantes.

2.5.1. Capacidad de formación de espuma.

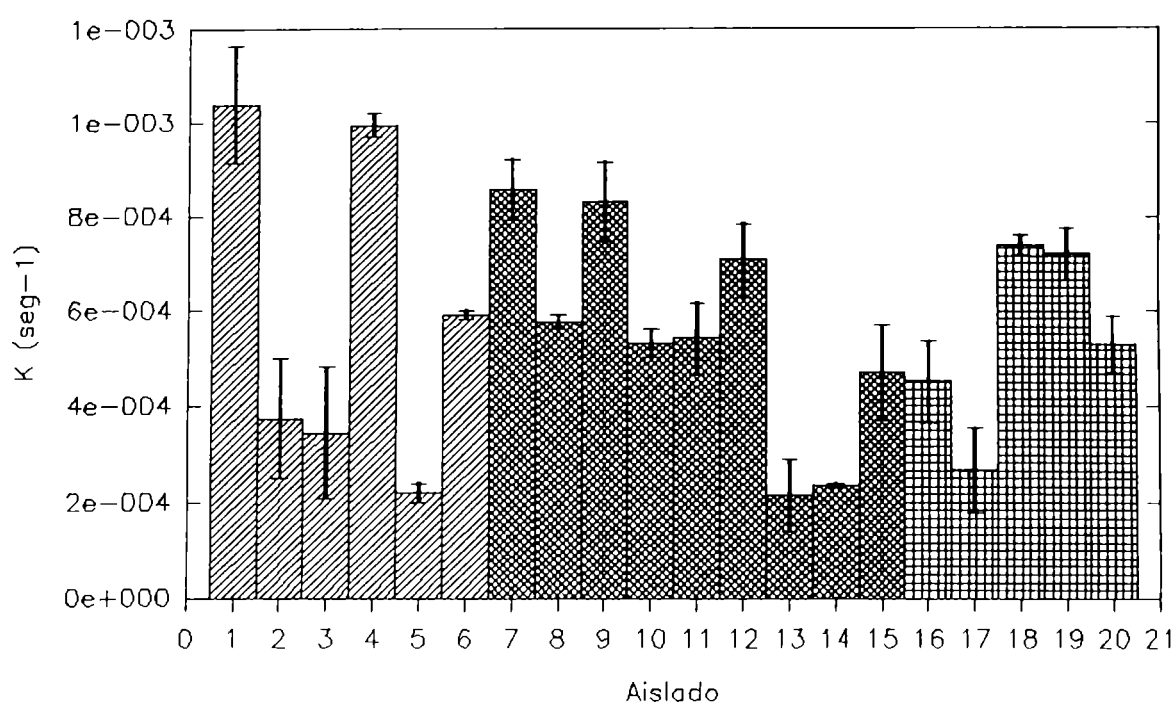
En la **Figura 49** se muestra el porcentaje de líquido incorporado a la espuma (**49.1**) y la constante de velocidad de incorporación de los aislados estudiados (**49.2**). El mayor poder espumante lo muestran los aislados 1 y 4. Ambos son aislados nativos, uno a pH 7 y otro a pH 9. Si los comparamos con el aislado 7 también nativo pero dializado, se detecta en este último un menor poder espumante. El mismo puede atribuirse al contenido salino ya que un incremento en la fuerza iónica favorece la formación de espuma. No debe olvidarse que durante la diálisis se pierden algunas proteínas del suero las que también podrían ser responsables del mayor poder espumante de los aislados no dializados. El aislado 8 que

sufrió tratamiento con Na_2SO_3 es peor agente espumante que el aislado 7. A los aislados 11 y 14 el tratamiento reductor no le altera el poder espumante. Los aislados 12 y 15 que sufrieron tratamiento reductor en presencia de urea y que se encuentran totalmente desnaturalizadas y con la subunidad AB disociada son mejores agentes espumantes que las muestras 11 y 14. El aislado 15 a su vez presenta un mayor poder espumante que la muestra 13 no reducida. Este resultado coincide con los de Kim y Kinsella (1986 y 1987), quienes observaron una mejora en las propiedades espumantes de la glicinina reducida con ditiotreitól en presencia de urea. Cuando se comparan los aislados 7; 10 y 13 se observa que para que el aislado tenga mayor poder espumante la relación glicinina/ β -conglucina debe ser como la de un aislado nativo normal (obtenido por precipitación directa a pH 4.5) y que tanto el aislado más rico en la fracción 7S como en la 11S son peores agentes espumantes.



49.1





49.2

Figura 49: Porcentaje de líquido incorporado a la espuma (49.1) y constante de velocidad de incorporación de líquido a la espuma (49.2) correspondiente a los diferentes aislados estudiados.

El tratamiento térmico que va acompañado de pérdida de solubilidad (muestras 2; 3; 5 y 6) produce una disminución de la capacidad de formar espuma. Si no hay pérdida de solubilidad también se observa una disminución del poder espumante, pero la misma es menor (muestras 16 y 17).

Ninguno de los aislados modificados mejora en su capacidad espumante al nativo. Esto puede ser atribuido al hecho que para la formación de espuma no sólo se requiere un alta velocidad de migración a la interfase que sería favorecida por ejemplo por una disociación de la glicinina o por un incremento de hidrofobicidad, sino que la proteína debe tener cierta estructura, por ejemplo las proteínas globulares como la albúmina bovina y lisozima forman films superficiales rígidos y más cohesivos que las proteínas débilmente estructuradas como la β -caseína (Graham y Phillips, 1979).

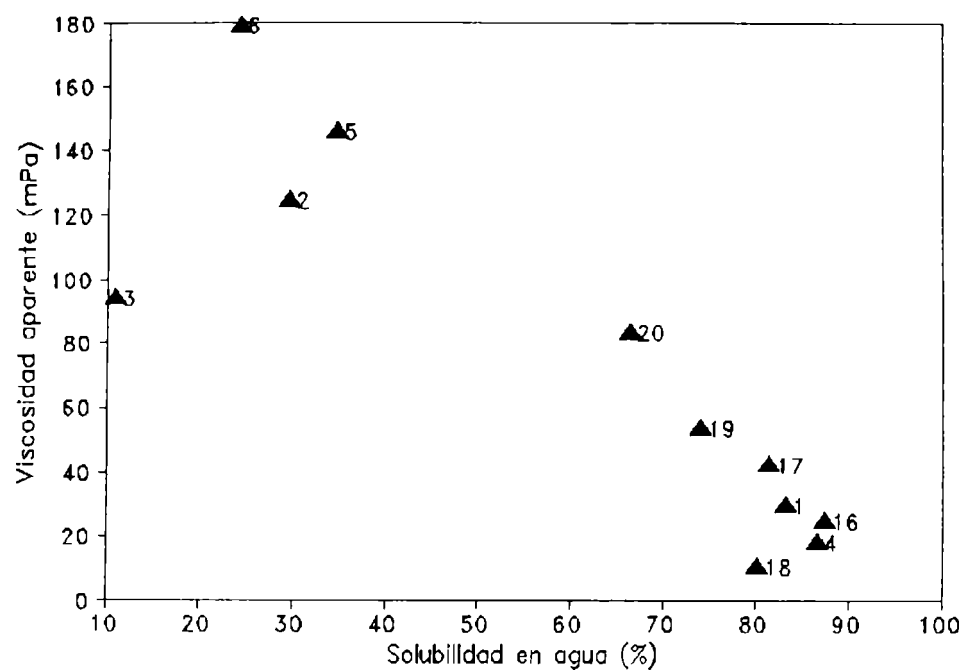
2.5.2. Estabilidad de la espuma.

Los aislados que muestran reducción del volumen de espuma luego de 30 minutos de finalizado el burbujeo son el 2; 3; 5; 6; 13; 14; 15; 16 y 17; la misma es del 37%, 62%, 53%; 96%, 9%, 23%, 96%, 91% y 92% por lo que todas estas espumas son muy inestables. Todos los aislados pierden líquido por drenado lo que indica una reducción del espesor del film interfacial, hecho que promueve la desestabilización. En aquellos aislados en los que se observó reducción del volumen de espuma el drenaje fue total.

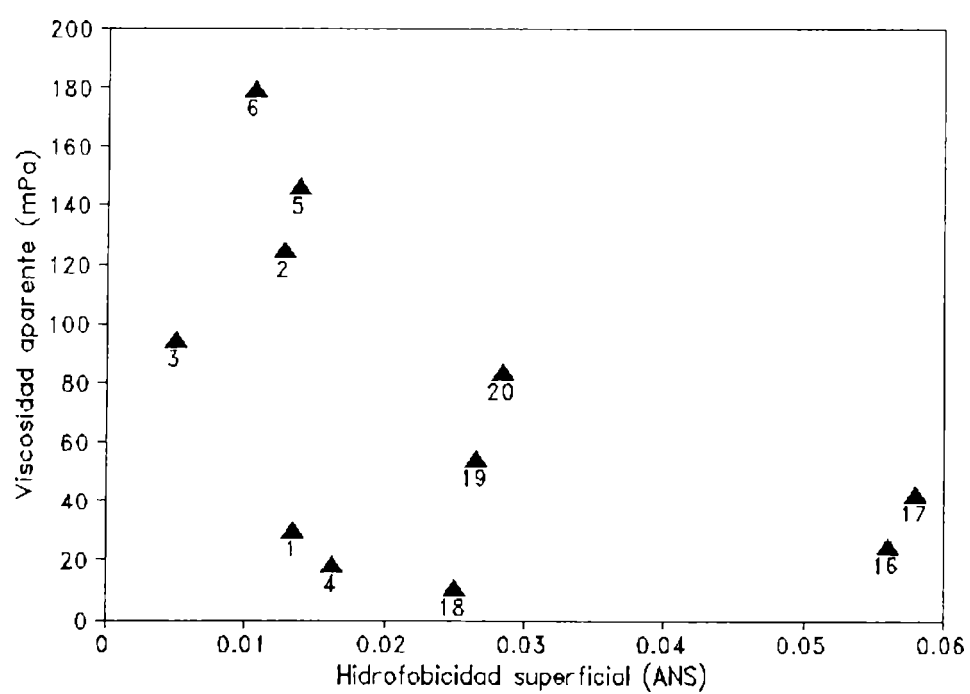
El poder espumante generalmente correlaciona con la hidrofobicidad expuesta mientras que la capacidad de emulsificación correlaciona con la hidrofobicidad superficial (Townsend y Nakai, 1983 y Nakai y Li-Chan 1985). Esto se debe a que durante la formación de la espuma se da tiempo suficiente para que la proteína se desnaturalice en la interfase, mientras que la formación de la emulsión es mucho más rápida. En este comportamiento influye el efecto desnaturalizante que ejerce la diferencia de polaridad que existe entre el aire y el aceite. Estos aislados poseen la misma hidrofobicidad expuesta, por lo tanto las diferencias observadas deben ser atribuidas a alguna otra causa; por ejemplo el mayor contenido salino o la pérdida de proteínas de bajo peso molecular de los aislados dializados. Sin embargo estas proteínas también aportarían a la hidrofobicidad total. El contenido salino puede afectar el grado de asociación/disociación, lo que hace que los aislados no dializados a pH 7 y pH 9 migren más rápidamente a la interfase.

3. Relación entre propiedades estructurales y funcionales.

La **Figura 50** muestra la relación existente entre viscosidad y solubilidad en agua y entre viscosidad e hidrofobicidad superficial determinada con ANS. En el primer caso se observa una disminución de la viscosidad cuando aumenta la solubilidad. Se detecta una tendencia que indica que los aislados con alta hidrofobicidad superficial presentan baja viscosidad. Sin embargo muestras con H_0 muy diferentes tienen iguales valores de viscosidad. Las modificaciones más importantes en la viscosidad son producidas por la presencia de agregados insolubles. Las fracciones solubles poseen un volumen hidrodinámico similar, a pesar de poseer diferente hidrofobicidad superficial que podría favorecer tanto la formación de agregados solubles como la disminución de la capacidad de hidratación de la proteína.



50.1



50.2

Figura 50: Relación entre la viscosidad (mPa) y la solubilidad en agua (50.1) y relación entre la viscosidad y la hidrofobicidad superficial determinada con ANS (50.2)

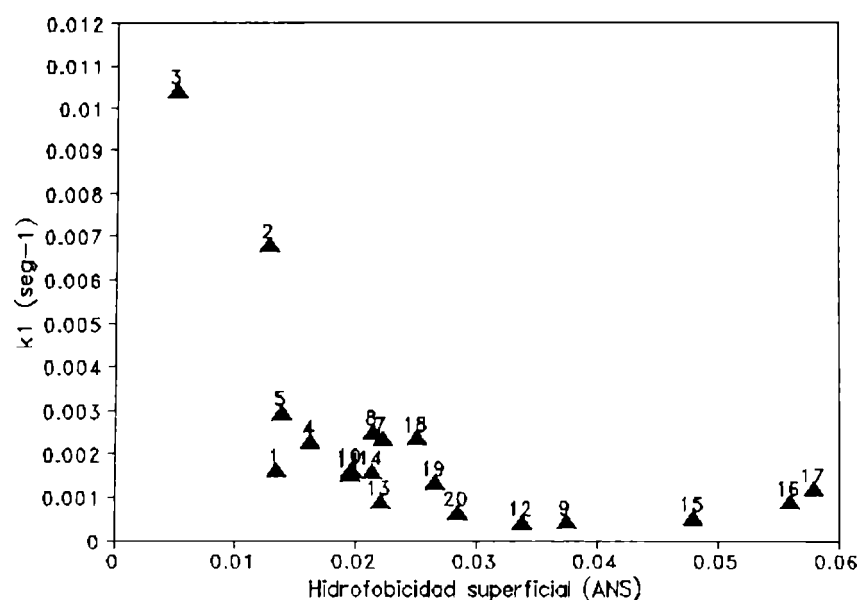
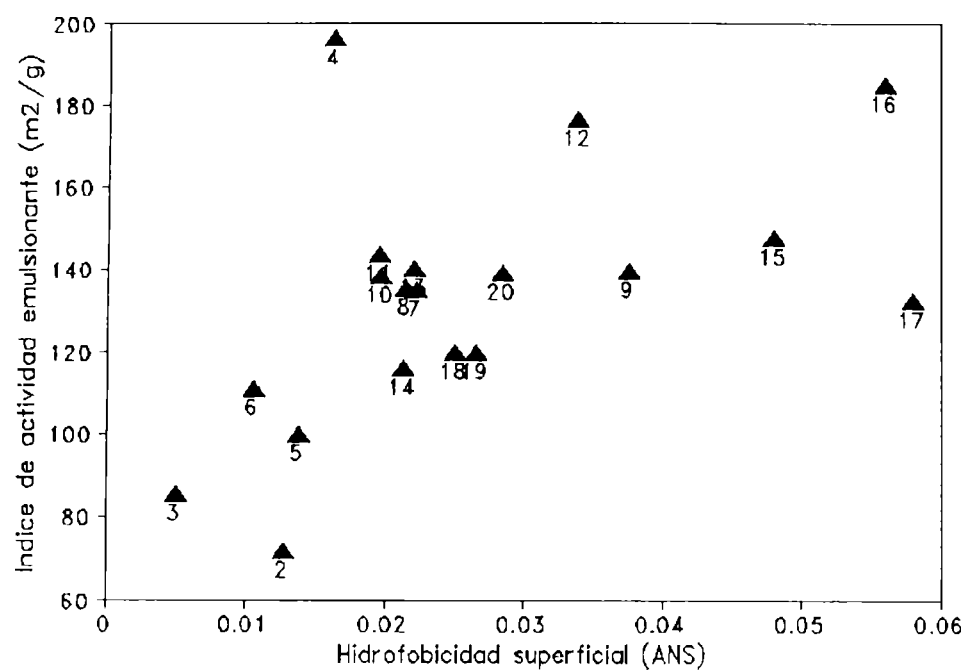


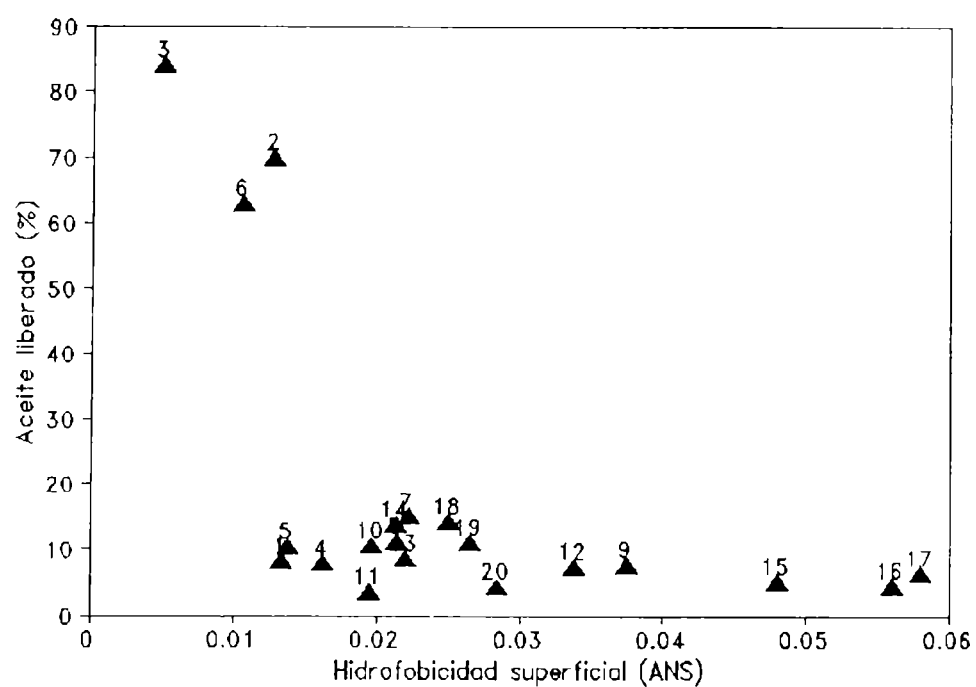
Figura 51: Relación entre la constante de velocidad de desestabilización del proceso de floculación y cremado (k_1) y la hidrofobicidad superficial determinada con ANS.

Por último se analizó la relación entre propiedades emulsionantes y solubilidad y propiedades emulsionantes e hidrofobicidad superficial. La primera muestra que aislados muy insolubles son malos agentes emulsionantes, pero para aislados de solubilidad superior al 40% no existe ninguna tendencia. Al analizar la relación existente entre estas propiedades e hidrofobicidad superficial, se observa una buena relación entre k_1 y H_0 , presentando las muestras más hidrofóbicas bajas constantes de velocidad de desestabilización por floculación-cremado (**Figura 51**). Al comparar los valores de índice de actividad emulsionante o de coalescencia en función de la hidrofobicidad superficial (**Figuras 52.1 y 52.2**, respectivamente) se detecta la misma tendencia aunque la dispersión es mucho mayor. También se observa una relación inversa entre fracción volumétrica de aceite en el equilibrio y la hidrofobicidad superficial (**Figura 53**). La relación existente entre propiedades emulsionantes e hidrofobicidad superficial ya ha sido informada por otros autores (Kato y Nakai, 1980; Li-Chan y col 1985; Kato, 1991).

No se observó ninguna correlación entre las propiedades espumantes y las medidas de solubilidad o de hidrofobicidad superficial y tampoco entre estas propiedades y el contenido de grupos sulfhidrilos libres o grupos sulfonatos incorporados.



52.1



52.2

Figura 52: Relación entre el índice de actividad emulsionante (IAE) y la hidrofobicidad superficial determinada con ANS (52.1) y entre el porcentaje de aceite liberado por coalescencia y la hidrofobicidad superficial determinada con ANS (52.2).

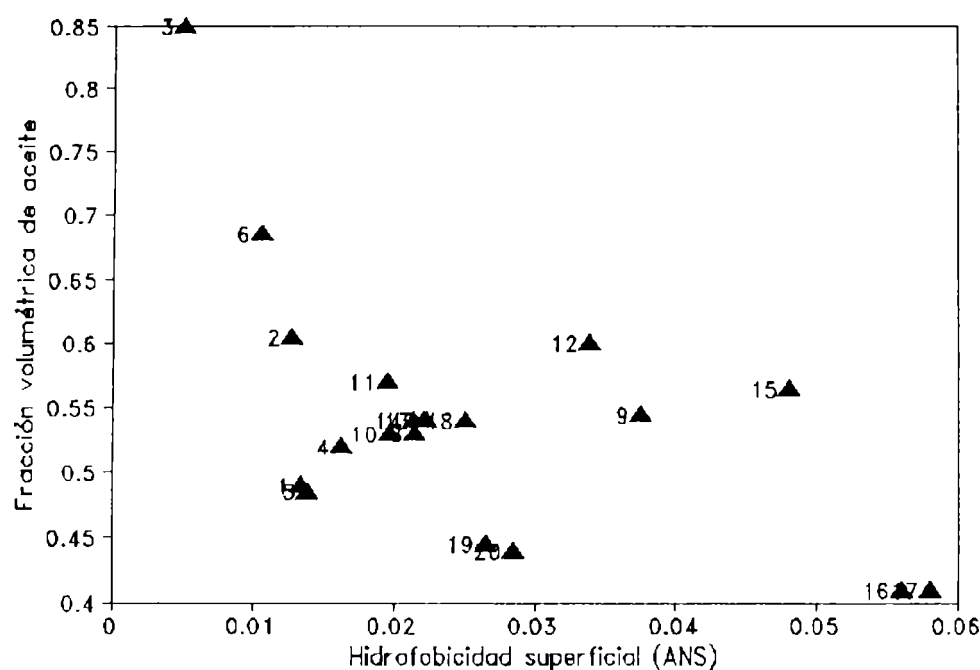


Figura 53: Relación entre la fracción volumétrica de aceite en el equilibrio y la hidrofobicidad superficial determinada con ANS.

CONCLUSIONES

Los tratamientos térmicos prolongados a alta concentración de proteína provocan agregación y pérdida de solubilidad produciéndose un aumento en la capacidad de absorción de agua del aislado y de la viscosidad. Estos aislados poseen las globulinas 7S y 11S completamente desnaturalizadas, agregados de la subunidad AB-11S estabilizados por uniones disulfuro y agregados de β -7S/B-11S en los que intervienen uniones disulfuro y también uniones susceptibles a la acción de la urea y del SDS. También poseen una baja hidrofobicidad superficial y carecen de propiedades de superficie.

Los tratamientos térmicos cortos a concentración de proteína del 4% producen aislados con alta solubilidad e hidrofobicidad superficial. Dependiendo de si la temperatura a la que se trata el aislado alcanza la temperatura de desnaturalización de la fracción 11S, se tienen aislados con la globulina 7S completamente desnaturalizada y la 11S parcialmente desnaturalizada o ambas completamente desnaturalizadas. Estos aislados presentan además la subunidad AB agregada a través de interacciones disulfuro, que es parcial en el primer

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

caso y completa en el segundo. Presentan también agregados de β -7S y B-11S. Estos aislados, junto con los que contienen la subunidad intermedia AB completamente disociada, son los que poseen mejores propiedades emulsionantes.

Los tratamientos térmicos producen una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos libres ($< 0.8\mu\text{M SH/g proteína}$), ya que se produce agregación a través de uniones disulfuro. Los valores normales de un aislado sin tratamiento térmico son de $1.5\text{-}1.8\mu\text{M SH/g proteína}$. Si los aislados sufrieron un tratamiento reductor los valores de SH libres son superiores a $2.0\mu\text{M SH/g proteína}$, salvo que hayan sufrido simultáneamente un tratamiento térmico. Los tratamientos reductores suaves (Na_2SO_3 0.05 %) prácticamente no modifican la carga, ni la hidrofobicidad superficial por lo que tampoco modifican las propiedades de superficie.

Los valores de hidrofobicidad superficial determinados con ANS o CPA son equivalentes para los aislados producidos por los distintos tratamientos, con excepción de los aislados más ricos en la globulina 7S que presentan una mayor hidrofobicidad alifática (determinada tanto con CPA como con DPH). Los tratamientos efectuados prácticamente no modifican los valores de hidrofobicidad total salvo que exista una alta proporción de proteínas insolubles. La modificación del contenido de 7S u 11S tampoco modifica la hidrofobicidad total.

El incremento del pH de 7 a 9 de un aislado nativo mejora sus propiedades emulsionantes. Dicha modificación puede deberse a cambios en el grado de asociación-disociación que se mantienen aún durante la medida a pesar de que siempre se trabaja a la misma fuerza iónica y pH o bien a la diferencia de contenido salino del aislado.

Los aislados enriquecidos en 7S son mejores agentes emulsionantes que los que poseen una composición normal o son ricos en 11S. Este mayor poder emulsionante está de acuerdo con su mayor hidrofobicidad con DPH. Los aislados de composición normal son mejores agentes espumantes que aquellos que sufrieron una modificación de la proporción 7S y 11S.

Los aislados con mayor grado de sulfonación que no sufrieron modificaciones en su solubilidad ni en su hidrofobicidad (muestras 18, 19 y 20), y que presentan a las globulinas 7S y 11S con distinto grado de desnaturalización no mostraron cambios en sus propiedades emulsionantes y espumantes.

Los aislados no dializados son mejores agentes espumantes que los dializados. Dado que la diálisis se realizó contra agua es muy probable que se haya modificado el estado de asociación-disociación de las globulinas 7S y 11S, también se pierden algunos componentes de bajo peso molecular. Estas modificaciones se mantienen al realizar medidas de

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

propiedades emulsionantes y espumantes a la misma fuerza iónica. Por lo tanto los cambios en el estado de asociación-disociación que se hayan producidos deben haberse fijado por ejemplo a través de la formación de uniones disulfuro durante la liofilización o bien la diferencia se debe a las características de las proteínas del suero (ya sea que actúen como agentes tensoactivos o influyan en la estabilidad del film). Sin embargo estos factores no están afectando a las propiedades emulsionantes.

Regulando las condiciones de tratamiento térmico: temperatura, tiempo, pH y concentración de proteína, es posible obtener aislados de alta hidrofobicidad superficial y solubilidad y por ende buenas propiedades emulsionantes. Concentraciones de proteína del 10% producen insolubilización y agregación, lo que lleva a la producción de aislados con alta capacidad para retener agua y formar soluciones viscosas. Tratamientos a una concentración de proteína de 4% producen un incremento de la hidrofobicidad superficial sin pérdida de solubilidad. La alcalinización a pH 9 favorece la disociación de la subunidad AB durante el tratamiento térmico y una mayor desnaturalización. La reducción de la glicinina en presencia de urea y Na_2SO_3 0.05% produce una sulfonación del 15-20% sin que ocurra pérdida de solubilidad de los polipéptidos A y B, estos aislados presentan una alta hidrofobicidad superficial y buenas propiedades emulsionantes. El incremento del contenido de 7S produce un aumento de la hidrofobicidad alifática y mejora en las propiedades emulsionantes.

Los resultados obtenidos indican que la evaluación de las propiedades emulsionantes de los aislados modificados requiere de la medida de más de una propiedad ya que las variaciones producidas por el tratamiento afecta en diferente forma a la capacidad de adsorberse a la interfase y de formar un film estable. Se observó migración de todos los componentes del aislado a la interfase salvo el polipéptido A que migra en menor extensión, por lo que el film es heterogéneo siendo la mezcla más eficiente cuanto mayor es el contenido de 7S.

Las únicas correlaciones observadas fueron entre propiedades emulsionantes e hidrofobicidad superficial que ya ha sido descrita por otros autores (Kato y Nakai, 1980; Voutsinas y col 1985, Hayakawa y Nakai, 1985, Li-Chan y col 1985, Kato 1991, etc). La relación existente entre otras características estructurales: grado de desnaturalización, tipo de agregados presentes, grupos sulfonatos incorporados, sulfhidrilos libres y uniones disulfuro, hidrofobicidad total y modificación en el peso molecular medio y las propiedades de superficie es difícil de cuantizar.

CONCLUSIONES

El análisis de la composición proteica de los aislados de proteínas de soja muestra que presentan en mayor proporción a las globulinas 7S y 11S, hallándose un menor contenido de otros componentes de la fracción 7S y proteínas del suero. Parte de la globulina 7S se encuentra formando agregados de peso molecular 100-200 Kdal, estabilizados por uniones disulfuro. Los agregados de mayor peso molecular (agregados tipo 1) están constituidos por trímeros o dímeros de las subunidades α' y α . Son más estables a tratamientos térmicos y cambios de fuerza iónica que los agregados 2 de tipo 2. Estos presentan en su constitución el polipéptido A-11S además de las subunidades α' y α . Cambios en las proporciones relativas de estos agregados correlacionan con modificaciones en la viscosidad del aislado producidas por la adición de sales. Estos agregados también se encuentran presentes en harinas de soja desgrasadas. Las subunidades de la β -conglucina ($\alpha'\alpha$ y β) que no forman parte de los agregados previamente mencionados interactúan entre sí de manera no covalente.

La reducción de aislados de proteínas de soja con Na_2SO_3 es muy limitada. Se puede mejorar parcialmente utilizando como catalizadores cobre u oxígeno, pero los mismos no mejoran el acceso a las uniones disulfuro involucradas en la unión de los polipéptidos A y B-11S como ocurre en proteínas más simples. Los componentes proteicos que son afectados por el tratamiento reductor son dependientes de las condiciones en las que se produce la reacción. Si la reacción se realiza en presencia de urea se reducen fundamentalmente los dímeros AB de la glicina mientras que si se emplean únicamente Cu y/o oxígeno se reducen fundamentalmente componentes distintos de AB-11S.

La agregación de la subunidad intermedia AB de la glicina requiere tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 85°C , necesitándose tiempos notablemente menores si el tratamiento se realiza a pH 9 o 10. El incremento de la concentración del aislado favorece dicha agregación aunque la misma ocurre a concentraciones menores de 10 mg/ml. La presencia de Na_2SO_3 o el incremento del pH favorece la agregación β -7S/B-11S, probablemente debido a que facilita la disociación de la subunidad AB. Los agregados β -7S/B-11S no se han podido aislar, sin embargo la presencia de interacciones β -7S y B-11S son indudables ya que en los primeros estados de formación se observa una disminución de la solubilidad de estas subunidades en agua, siendo solubles en SDS. Estos agregados se estabilizan en estado avanzado de formación a través de uniones disulfuro. El tratamiento térmico es indispensable para que ocurra la interacción β -7S/B-11S, ya que aislados que sufrieron disociación de los dímeros AB por tratamientos reductores en presencia de un

agente desnaturizante, no presentan este tipo de interacciones. Modificaciones en los pares tiempo-temperatura empleados junto con el pH del medio en que se efectúa el tratamiento térmico de aislados de proteínas de soja pueden dar origen aislados con agregados AB-11S a través de uniones disulfuro, β -7S/B-11S por uniones no covalentes, o bien aislados que carezcan de este tipo de agregados. Estos tratamientos pueden realizarse antes o después de la precipitación isoeléctrica, en el proceso de obtención de aislados, ya que no se observaron modificaciones en los requerimientos de temperatura por las modificaciones en la fuerza iónica que produce el agregado de HCl durante la precipitación isoeléctrica o de NaOH durante la neutralización.

La reducción de uniones disulfuro tiene como finalidad incrementar la flexibilidad molecular a fin de permitir un mejoramiento en la capacidad de proteínas de adsorberse y reordenarse en la interfase. El Na_2SO_3 posee un potencial de óxido-reducción muy bajo, el empleo de catalizadores mejora el grado de reducción, pero no es capaz de lograr que la estructura globular de la glicinina se abra. El empleo de tratamientos térmicos como agente desnaturizante, para promover la reducción de las uniones disulfuro comprometidas en la unión de los polipéptidos A y B-11S, no es posible debido a que es necesario alcanzar la temperatura de desnaturización para que el mismo acceda a las uniones no expuestas y a esta temperatura empiezan a ocurrir reacciones de agregación de la subunidad AB que dificultan dicho acceso.

Tratamientos térmicos a temperaturas superiores a la temperatura de desnaturización de la glicinina y a concentraciones de proteína de 10% (p/v) producen agregación e insolubilización, lo que lleva a la producción de aislados con alta capacidad para retener agua y formar soluciones viscosas, que poseen dependiendo del tiempo de tratamiento térmico la globulina 7S desnaturizada y la 11S parcial o totalmente desnaturizada, con agregados de la subunidad AB a través de uniones disulfuro y β -7S/B-11S, tanto por interacciones covalentes como no covalentes. La alcalinización a pH 9 favorece la disociación de la subunidad AB durante el tratamiento térmico y una mayor desnaturización. Estos aislados poseen una baja hidrofobicidad superficial y carecen de propiedades de superficie.

Tratamientos térmicos controlados a una concentración de proteína de 4% producen un incremento de la hidrofobicidad superficial sin pérdida de solubilidad, obteniéndose aislados con la β -conglucina desnaturizada y la glicinina parcialmente nativa o ambas globulinas completamente desnaturizadas dependiendo de la temperatura que alcanza el aislado durante

el tratamiento térmico. Estos aislados se destacan en sus propiedades emulsionantes aunque no existe una diferencia notable causada por el grado de desnaturalización que posee la globulina 11S.

La reducción de la glicinina en presencia de urea y Na_2SO_3 0.05% produce una sulfonación del 15-20% sin que ocurra pérdida de solubilidad de los polipéptidos A y B, ni agregación β -7S/B-11S. Estos aislados presentan una alta hidrofobicidad superficial y buenas propiedades emulsionantes. Tratamientos reductores con Na_2SO_3 0.05% en ausencia de desnaturalizantes no afectan significativamente la funcionalidad del aislado. Tampoco se modifica notablemente por tratamientos con Na_2SO_3 2.0%, que producen una elevada sulfonación superficial. El tratamiento térmico a estas concentraciones de reductor aún a 92°C , no causa desnaturalización de la globulina 11S, ya que el incremento de la fuerza iónica estabiliza la estructura. Esta es otra limitación a la acción reductora del Na_2SO_3 , son necesarias elevadas concentraciones para que la reacción de reducción se desplace hacia la reducción, pero el incremento de la fuerza iónica estabiliza la estructura globular aumentando la temperatura de desnaturalización, que dificulta el empleo de calor para mejorar el acceso.

Las modificaciones en las proporciones relativas de 7S y 11S afectan las propiedades emulsionantes y espumantes del aislado. El incremento del contenido de 7S produce un aumento de la hidrofobicidad alifática y mejora en las propiedades emulsionantes. Los aislados con contenidos relativos normales de 7S y 11S son los que exhiben mejores propiedades espumantes.

Los resultados obtenidos indican que la evaluación de las propiedades emulsionantes de los aislados modificados requiere de la medida de más de una propiedad ya que el tratamiento afecta en diferente forma a la capacidad de adsorberse a la interfase y de formar un film estable. Se observó migración de todos los componentes del aislado a la interfase salvo el polipéptido A que migra en menor extensión, por lo que el film es heterogéneo siendo la mezcla más eficiente cuanto mayor es el contenido de 7S.

Las únicas correlaciones observadas fueron entre propiedades emulsionantes e hidrofobicidad superficial que ya ha sido descrita por otros autores (Kato y Nakai, 1980; Voutsinas y col 1985, Hayakawa y Nakai, 1985, Li-Chan y col 1985, Kato 1991, etc). La relación existente entre otras características estructurales: grado de desnaturalización, tipo de agregados presentes, grupos sulfonatos incorporados, sulfhidrilos libres y uniones disulfuro, hidrofobicidad total y modificación en el peso molecular medio y las propiedades de

superficie es difícil de cuantizar ya que por ejemplo aislados que difieren en su grado de desnaturalización y tipo de agregados presentes se comportan funcionalmente de manera muy similar, por lo que deben utilizarse otro tipo de características estructurales para cuantizar diferencias de comportamiento.

BIBLIOGRAFIA

- Argos, P; Narayana, S.V.L.; Nielsen, N.C.**(1985) Structural similarity between legumin and vicilin storage from legumes. *EMBO J.*: 4: 1111-1117.
- Arrese,E.L.** (1991). Estudio de propiedades de aislados proteicos de soja. Influencia del tratamiento térmico y del contenido de calcio. Ph Thesis. Universidad Nacional de La Plata.
- Babajimopoulos, M.; Damodaran, S.; Rizvi, S.S.H.; Kinsella, J.E.**(1983). Effects of Various Anions on the Rheological and Gelling Behavior of Soy Proteins: Thermodynamic Observations. *J.Agric.Food Chem.*: 31: 1270-1275.
- Badley, R.A.; Atkinson, D.; Hauser, H.; Oldani, D.; Green, J.P.; Stubbs, J.M.**(1975). The Structure, Physical and Chemical Properties of the Soy Bean Protein Glycinin. *Biochim. Biophys. Acta*: 412: 214-228.
- Barraquio, V.L.; van de Voort, F.R.** (1988). Milk and Soy Protein: Their Status in Review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*: 21(5): 477-493.
- Barton, K.A.; Thompson, J.F.; Madison, J.T.; Rosenthal, R.; Jarvis, N.P.; Beachy,R.N.** (1982). The biosynthesis and processing of high molecular weight precursors of soybean glycinin subunits. *J.Biol.Chem.*: 257: 6089-6095.
- Beveridge, T.; Toma, S.J.; Nakai, S.** (1974). Determination of SH- and SS-Groups in Some Food Proteins Using Ellman's Reagent. *J.Food Sci.*: 39: 49-51.
- Bigelow, C.C.**(1967). On the average hydrophobicity of proteins and the relation between in and protein structure. *J. Theoret.Biol.*: 16: 187.
- Brassard, E.; Turmel, C.; Noolandi, J.** (1991). Observation of orientation and relaxation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes during pulsed intermittent field polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*; 1991; (12): 373-375.
- Campbell, N.F.; Shih, F.F.; Marshall, W.E.** (1992) Enzymatic Phosphorylation of Soy Protein Isolate for Improved Functional Properties. *J.Agric.Food Chem.*: 40(3): 403-406.
- Cardamone, M.; Puri, N.K.**(1992). Spectrofluorimetric Assessment of the Surface Hydrophobicity of Proteins. *Biochemical Journal*: 282: 589-593.
- Catsimpoolas, N.; Ekenstain, C.** (1969). Isolation of alpha, beta, and gamma conglycinins. *Arch. Biochem. Biophys.*: 129: 490.
- Catsimpoolas, N.; Meyer, E.W.** (1970). Gelation Phenomena of Soybean Globulins. I. Protein-Protein Interactions. *Cereal Chemistry*: 47: 559-570.
- Cheftel, J.C.** (1989). Propiedades funcionales de proteínas. En "Proteínas Alimentarias" (Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España) Capítulo 4, pp 49-100.

Chrispeels, M.J.; Higgins, T.J.V.; Craig, S.; Spencer, D.(1982). Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and kinetics of their transport to proteins bodies in developing pea cotyledons. *J.Cell Biol.*: 93: 5-14.

Dagorn-Scaviner, C.; Gueguen, J.; Lefebvre, J.(1987). Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *J. Food Sci.*: 52(2): 335-341.

Damodaran, S.; Kinsella, J.E. (1982). Effect of Conglycinin on the Thermal Aggregation of Glycinin. *J. Agric.Food Chem.*: 30(5): 812-817.

Damodaran, S. (1985). Estimation of Disulfide Bonds Using 2-Nitro-5-thiosulfobenzoic Acid: Limitations. *Analytical Biochemistry.*: 145: 200-204.

Damodaran, S. (1986). Kinetics of formation of hydrophobic regions during refolding of bovine serum albumin. *Int. J. Pept.Protein Res.*: 27: 589-596.

Damodaran, S. (1987). Influence of solvent conditions on refolding of bovine serum albumin. *Biochim.Biophys.Acta*: 914: 114-121.

Damodaran, S.; Song, K.B. (1988). Kinetics of adsorption of proteins at interfaces: role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochim. Biophys. Acta*: 954: 253-264.

Damodaran, S. (1988). Refolding of Thermally Unfolded Soy Proteins during the Cooling Regime of the Gelation Process: Effect on Gelation. *J. Agric.Food Chem.*: 36(2): 262-269.

Damodaran, S. (1989). Interrelationship of Molecular and Functional Properties of Food Proteins. En "Food Proteins"(Ed. J. E. Kinsella and Soucie, W.G. The American Oil Chemists'Society) Chapter 3,pp 21-51.

Das, K.P.; Kinsella, J.E. (1990). Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and nonprotein emulsifiers. *Advances in Food and Nutrition Research*: 34: 81-201.

Dickinson, E.; Galazka, V.B. (1991). Bridging flocculation induced by competitive adsorption: implications for emulsion stability. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*; 87(7): 963-969.

Doyle, J.F.; Schuler, M.A.; Dean Godette, W.; Zenger, V.; Beachy, R.N. (1986). The Glycosylated Seed Storage Proteins of Glycine max and Phaseolus vulgaris. *J.Biol. Chem.*: 261(20): 9228-9238.

Fleming, S.E.; Sosulski, F.W.; Kilara, A; Humbert, E.S. (1974). Viscosity and water absorption characteristics of slurries of sunflower and soybean flours, concentrates and isolates. *J.Food Sci.*: 39: 188.

- Franzen, K.L.; Kinsella, J.E.** (1976). Functional Properties of Succinylated and Acetylated Soy Proteins. *J. Agric.Food Chem.*: 24(4): 788-795.
- Fukushima, D.** (1968). Internal structure of 7S and 11S globulin molecules in soybean proteins. *Cereal Chemistry*: 45: 203.
- Fukushima, D.** (1991 a). Recent Progress of Soybean Proteins Foods: Chemistry, Technology, and Nutrition. *Food Reviews International*: 7(3): 323-351.
- Fukushima, D.** (1991 b). Structures of Plants Storage Proteins and their Functions. *Food Reviews International*: 7(3): 353-381.
- George, A.A.; Delumen, B.O.** (1991). A Novel Methionine-Rich Protein in Soybean Seed -Identification, Amino Acid Composition, and N-Terminal Sequence. *J.Agric. Food Chem.*: 39(1): 224-227.
- German, B.; Damodaran, S.; Kinsella, J.E.** (1982). Thermal Dissociation and Association Behavior of Soy Proteins. *J.Agric.Food Chem.*: 30:807-811.
- German, J.B.; O'Neill, T.E.; Kinsella, J.E.** (1985). Film forming and foaming behavior of food proteins. *J.Am.Oil Chem.Soc*: 62(9): 1358-1366.
- Gibbs, P.E.M.; Strongin, K.B.; Mc Pherson, A.** (1989). Evolution of legume seed storage proteins. A domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. *Mol. Biol. Evol.*: 6: 614-623.
- Gonzalez, J.M.; Damodaran, S.** (1990 a). Sulfitolysis of Disulfide Bonds in Proteins Using a Solid-State Copper Carbonate Catalyst. *J.Agric.Food Chem.*: 38(1): 149-153.
- Gonzalez, J.M.; Damodaran, S.** (1990 b). Recovery of Proteins from Raw Sweet Whey Using a Solid State Sulfitolysis. *J.Food Sci.*: 55(6): 1559-1563.
- Gornall, A.C.; Bardawill, C.J.; David, N.M.** (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J.Biol.Chem.*: 177, 751-766.
- Graham, D.E.; Phillips, M.C.** (1979 a). Protein at liquid interfaces: I- Kinetics of adsorption and surface denaturation. *J. Colloid Interface Sci.*: 70: 403-414.
- Graham, D.E.; Phillips, M.C.** (1979 b). Protein at liquid interfaces: II- Adsorption isotherms. *J. Colloid Interface Sci.*: 70: 415-426.
- Graham, D.E.; Phillips, M.C.** (1979 c). Protein at liquid interfaces: III- Molecular structures of adsorbed films. *J. Colloid Interface Sci.*: 70: 427-439.
- Halling, P.J.** (1981). Protein-Stabilized Foams and Emulsions. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 15: 155-203.

- Haque, Z.; Kito, M.** (1982 a). Lipophilization of soybean glycinin: covalent attachment to long chain fatty acids. *Agric.Biol.Chem.*: 46: 597-599.
- Haque, Z.; Matoba, T.; Kito, M.** (1982 b). Incorporation of fatty acid into food protein: palmitoyl soybean glycinin. *J.Agric.Food Chem.*: 30: 481.
- Hashizume, K.; Nakamura, N.; Watanabe, T.** (1975). Influence of ionic strength on conformation changes of soybean proteins caused by heating and relationship of its conformation changes to gel formation. *Agric.Biol.Chem.*: 39: 1339.
- Hayakawa, S.; Nakai, S.** (1985 a). Contribution of Hydrophobicity, Net Charge and Sulfhydryl Groups to Thermal Properties of Ovalbumin. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*: 18(4): 290-295.
- Hayakawa, S.; Nakai, S.** (1985 b). Relationships of Hydrophobicity and Net Charge to the Solubility of Milk and Soy Proteins. *J.Food Sci.*: 50: 486-491.
- Hermansson, A.M.** (1972). Functional properties of proteins for food-swelling. *Lebensm-Wiss u Technol.*: 5: 24.
- Hermansson, A.M.** (1978). Physico-Chemical Aspects of Soy Proteins Structure Formation. *Journal of Texture Studies*: 9: 33-58.
- Hermansson, A.M.** (1979). Methods of Studying Functional Characteristics of Vegetable Proteins. *J.Am.Oil Chem.Soc.*: 56: 272-279.
- Hermansson, A.M.** (1986). Soy Protein Gelation. *J.Am.Oil Chem.Soc.*: 63(5): 658-666.
- Hirano, H.; Kagawa, H.; Kamata, Y.; Yamauchi, F.** (1987). Structural Homology among the Major 7S Globulin Subunits of Soybean Seed Storage Proteins. *Phytochemistry*: 26(1): 41-45.
- Hirotsuka, M.; Taniguchi, H.; Narita, H.; Kito, M.** (1984). Increase in Emulsification Activity of Soy Lecitin-Soy Protein Complex by Ethanol and Heat Treatments. *J.Food Sci.*: 49: 1105-1110.
- Humphrey, R.E.; Ward, M.H.; Hinze, W.** (1970). Spectrophotometric Determination of Sulfite with 4,4'-Dithiodipyridine and 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid). *Analytical Chemistry*: 42(7): 698-702.
- Iwabuchi, S.; Shibasaki, K.** (1982). Salt-induced Reconstitution of β -Conglycinin from Its Thermal Dissociates. *Agric.Biol.Chem.*: 46(6): 1481-1488.
- Iwabuchi, S.; Yamauchi, F.** (1987 a). Determination of Glycinin and β -Conglycinin in Soybean Proteins by Immunological Methods. *J.Agric.Food Chem.*: 35(2): 200-205.

Iwabuchi, S.; Yamauchi, F. (1987 b). Electrophoretic Analysis of Whey Proteins Present in Soybean Globulins Fraction. *J.Agric.Food Chem.*: 35(2): 205-209.

Iwabuchi, S.; Watanabe, H.; Yamauchi, F. (1991 a). Thermal Denaturation of β -Conglycinin - Kinetic Resolution of Reaction Mechanism. *J.Agric.Food Chem.*: 39(1): 27-33.

Iwabuchi, S.; Watanabe, H.; Yamauchi, F. (1991 b). Observations on the Dissociation of beta-Conglycinin into Subunits by Heat Treatment. *J.Agric.Food Chem.*: 39(1): 34-40.

Kakalis, L.T.; Baianu, I.C. (1990). High-Resolution Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study of the Soybean 7S Storage Protein Fraction in Solution. *J.Agric.Food Chem.*: 38(12): 2126-2132.

Kato, A.; Nakai, S. (1980). Hydrophobicity Determined by a Fluorescence Probe Method and its Correlation with Surface Properties of Proteins. *Biochim.Biophys.Acta*: 624: 13-20.

Kato, A.; Tsutsui, N.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K.; Nakai, S. (1981). Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*: 45: 2755-2760.

Kato, A.; Osako, Y.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K. (1983 a). Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agric. Biol. Chem.*: 47: 33-38.

Kato, A.; Takahashi, A.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K. (1983 b). Determination of Foaming Properties of Proteins by Conductivity Measurements. *J.Food Sci.*: 48: 62-65.

Kato, A.; Fujimoto, K.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K. (1986 a). Protein flexibility and functional properties of heat denatured ovalbumin and lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*: 50: 417-420.

Kato, A.; Yamaoka, H.; Matsudomi, N.; Kobayashi, K. (1986 b). Functional Properties of Cross-Linked Lysozyme and Serum Albumin. *J.Agric.Food Chem.*: 34: 370-372.

Kato, A.; Murata, K.; Kobayashi, K. (1988). Preparation and characterization of ovalbumin-dextran conjugate having excellent emulsifying properties. *J.Agric.Food Chem.*: 36: 421-425.

Kato, A. (1991). Significance of Macromolecular Interaction and Stability in Functional Properties of Food Proteins. *Interactions of Food Proteins*: 454: 13-24.

Kella, N.K.; Kinsella, J.E. (1985). A method for the controlled cleavage of disulfide bonds in proteins in the absence of denaturants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*: 11: 251-263.

Kella, N.K.; Barbeau, W.E.; Kinsella, J.E. (1986). Effect of Oxidative Sulfitolysis of Disulfide Bonds of Glycinin on Solubility, Surface Hydrophobicity, and in Vitro Digestibility. *J.Agric Food Chem.*: 34(2): 251-256.

Kella, N.K.; Yang, S.T.; Kinsella, J.E. (1989). Effect of Disulfide Bond Cleavage on Structural and Interfacial Properties of Whey Proteins. *J.Agric.Food Chem.*: 37(5): 1203-1210.

Kilara, A.; Sharkasi, T.Y. (1986). Effects of Temperature on Food Proteins and its Implications on Functional Properties. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 23(4): 323-395.

Kim, S.H.; Kinsella, J.E. (1985). Surface Activity of Food Proteins: Relationships Between Surface Pressure Development, Viscoelasticity of Interfacial Films and Foam Stability of Bovine Serum Albumin. *J.Food Sci.*: 50: 1526-1530.

Kim, S.H.; Kinsella, J.E. (1986). Effects of Reduction with Dithiothreitol on Some Molecular Properties of Soy Glycinin. *J.Agric.Food Chem.*: 34(4): 623-627.

Kim, S.H.; Kinsella, J.E. (1987). Surface Active Properties of Food Proteins: Effects of Reduction of Disulfide Bonds on Film Properties and Foam Stability of Glycinin. *J.Food Sci.*: 52(1): 128-131.

Kinsella, J.E. (1979). Functional Properties of Soy Proteins. *J.Am.Oil Chem.Soc*: 56: 242-258.

Kinsella, J.E. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. En "Food Proteins".(Fox,P.F.; London,G.G. Eds. Applied Science. Barking, Essex, England) pp.51-103.

Kinsella, J.E. (1984). Milk Proteins: Physicochemical and Functional Properties. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 21(3): 197-262.

Kinsella, J.E.; Phillips, L.G. (1989). Structure: function relationship in food proteins, film and foaming behavior. En "Food Proteins" (Edited by J.E.Kinsella y W.G. Soucie. The American Oil Chemists Society, Champaign. IL) Chapter 4, pp 52-77.

Kitamura, K.; Takagi, T.; Shibasaki, K. (1976). Renaturation of soybean 11S globulin. *Agric.Biol.Chem.*: 40: 1837.

Klemaszewski, J.L.; Das, K.P.; Kang, Y.J.; Kinsella, J.E. (1990). Effects of Controlled Sulfitolysis of Bovine Serum Albumin on Droplet Size and Surface Area of Emulsions. *J.Agric.Food Chem.*: 38(3): 647-650.

Klemaszewski, J.L.; Kinsella, J.E. (1991). Sulfitolysis of Whey Proteins- Effects on Emulsion Properties. *J.Agric. Food Chem.*: 39(6): 1033-1036.

Koshiyama, I. (1971). Some Aspects of Subunit Structure of a 7S Protein in Soybean Globulins. *Agric.Biol.Chem.*: 35(3): 385-392.

Koshiyama, I.; Fukushima, D. (1976). Purification and some properties of α -conglycinin in soybean seeds. *Phytochemistry*: 15: 161.

Kumosinski, T.F. (1990). Thermodynamic linkage and nonlinear regression analysis: a molecular basis for modeling biomacromolecular processes. *Advances in Food and Nutrition Research*: 34: 299-385.

I'Anson, K.J.; Bacon, J.R.; Lambert, N.; Miles, M.J.; Morris, V.J.; Wright, D.J.; Nave, C. (1987). Synchrotron radiation wide-angle X-ray scattering studies of glycinin solutions. *Int.J.Biol.Macromol.*: 9: 368-370.

Lei, M.G.; Tyrell, D; Bassette, R.; Reeck, G.R. (1983). Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of Soybean Proteins. *J.Agric.Food Chem.*: 31(5): 963-968.

Li-Chan, E.; Nakai, S.; Wood, D.F. (1985). Relationship Between Functional (Fat Binding, Emulsifying) and Physicochemical Properties of Muscle Proteins. Effects of Heating, Freezing, pH and Species. *J.Food Sci.*: 50: 1034-1040.

Li-Chan, E.; Nakai, S.; Wood, D.F. (1987). Muscle protein structure-function relationship and discrimination of functionality by multivariate analysis. *J.Food Sci.*: 52: 31-41.

Li-Chan, E.; Nakai, S. (1991). Importance of Hydrophobicity of Proteins in Food Emulsions. *Microemulsions and Emulsions in Foods*: 448: 193-212.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol.Chem.*: 193: 265.

Matsudomi, N.; Mori, H.; Kato, A.; Kobayashi, K. (1985). Emulsifying and foaming properties of heat denatured soybean 11S globulins in relation to their surface hydrophobicity. *Agric.Biol.Chem.*: 49: 915-919.

Melander, W.; Horvath, G. (1977 a). Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*: 183: 200.

- Melander, W.; Horvath, G.** (1977 b). Effect of neutral salts on the formation and dissociation of protein aggregates. *J. Solid Phase Biochem.*: 2: 141.
- Miles, M.J.; Morris, V.J.; Wright, D.J.; Bacon, J.R.** (1985). A study of the quaternary structure of glycinin. *Biochim. Biophys. Acta*: 827: 119-126.
- Momma, T.; Negoro, T.; Hirano, H.; Matsumoto, A.; Udaka, K.; Fukazawa, C.** (1985). Glycinin A5A4B3 mRNA: cDNA cloning and nucleotide sequencing of splitting storage protein subunit of soybean. *Eur. J. Biochem.*: 149: 491-496.
- Mori, T.; Utsumi, S.; Inaba, H.** (1979). Interaction Involving Disulfide Bridges Between Subunits of Soybean Seed Globulin and between Subunits of Soybean and Sesame Seed Globulins. *Agric. Biol. Chem.* 43(11): 2317-2322.
- Mori, T.; Utsumi, S.; Inaba, H.; Kitamura, K.; Harada, K.** (1981). Differences in Subunit Composition of Glycinin among Soybean Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*: 29(1): 20-23.
- Mori, T.; Nakamura, T.; Utsumi, S.** (1982 a). Formation of Pseudoglycinins and Their Gel Hardness. *J. Agric. Food Chem.*: 30(5): 828-831.
- Mori, T.; Nakamura, T.; Utsumi, S.** (1982 b). Gelation Mechanism of Soybean 11S Globulin: Formation of Soluble Aggregates as Transient Intermediates. *J. Food Sci.*: 47: 26-30.
- Mori, T.; Nakamura, T.; Utsumi, S.** (1986). Behavior of Intermolecular Bond Formation in the Late Stage of Heat-Induced Gelation of Glycinin. *J. Agric. Food Chem.*: 34(1): 33-36.
- Nakai, S.; Li-Chan, E.** (1985). Structure Modification and Functionality of Whey Proteins: Quantitative Structure- Activity Relationship Approach. *Journal of Dairy Science*: 68: 2763-2772.
- Nakai, S.; Li-Chan, E.; Hirotsuka, M.; Vazquez, M.C.; Arteaga, G.** (1991). Quantitation of Hydrophobicity for Elucidating the Structure Activity Relationships of Food Proteins. *Interactions of Food Proteins*: 454: 42-58.
- Nakamura, T.; Utsumi, S.; Kitamura, K.; Harada, K.; Mori, T.** (1984 a). Cultivar Differences in Gelling Characteristics of Soybean Glycinin. *J. Agric. Food Chem.*: 32: 647-651.
- Nakamura, T.; Utsumi, S.; Mori, T.** (1984 b). Network Structure Formation in Thermally Induced Gelation of Glycinin. *J. Agric. Food Chem.*: 32(2): 349-352.

Nakamura, T.; Utsumi, S.; Mori, T. (1985). Formation of Pseudoglycinins from Intermediary Subunits of Glycinin and Their Gel Properties and Network Structure. *Agric.Biol. Chem.*: 49(9): 2733-2740.

Nakamura, T.; Utsumi, S.; Mori, T. (1986). Mechanism of Heat Induced Gelation and Gel Properties of Soybean 7S Globulin. *Agric.Biol.Chem.*: 50(5): 1287-1293.

Nielsen, N.C. (1984). The chemistry of legume storage proteins. *Philos. Trans. R. Soc. London*, Ser. B: 304: 287-296.

Nielsen, N.C. (1985). The Structure and Complexity of the 11S Polypeptides in Soybeans. *J.Am.Oil Chem.Soc*; 62(12): 1680-1686.

Nielsen, N.C.; Dickinson, C.D.; Cho, T.J.; Thanh, V.H.; Scallon, B.J.; Fischer, R.L.; Sims, T.L.; Drews, G.N; Goldberg, R.B. (1989). Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell*: 1: 313-328.

Nishimura, T.; Utsumi, S.; Kito, M. (1989). Autoacylation of soy proteins. *J.Agric.Food Chem.*: 37: 1266-1270.

Ochiai, K.; Kamato, Y.; Shibasaki, K. (1982). Effect of tryptic digestion on emulsifying properties of soy protein. *Agric.Biol.Chem.*: 46: 91-96.

Ohtsuru, M.; Kito, M.; Takeuchi, Y.; Ohnishi, S. (1976). Association of Phosphatidylcholine with Soybean Protein. *Agric.Biol.Chem.*: 40: 2261-2266.

Ohtsuru, M.; Yamashita, Y.; Kanamoto, R.; Kito, M. (1979). Association of Phosphatidylcholine with Soybean 7S Globulin and its Effect on The Protein Conformation. *Agric.Biol.Chem.*: 43: 765-770.

Pearce, K.N.; Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J.Agric.Food Chem.*: 26(3): 716-723.

Pearson, A.M. (1982). Soy Proteins. En "Developments in Food Proteins-2" (B.J.F. Hudson, ed. Elsevier, London) Chapter 2: pp 67-108.

Phillips, M.C. (1981). Protein conformation at liquid interfaces and its roles in stabilizing emulsions and foams. *Food Technology*: 1: 50-57.

Plietz, P.; Damaschum, G.; Muller, J.J.; Schwenke, K.D. (1983 a). The structure of 11S globulins from sunflower and rape seed. A small angle x-ray scattering study. *Eur. J. Biochem.*: 130: 315-320.

Plietz, P.; Damaschun, G.; Muler, J.J.; Shlesier, B. (1983 b). Comparison of the structure of the 7S globulin from *Phaseolus vulgaris* in solution with the cristal structure of

7S globulin from *Canavalia ensiformis* by small angle X-ray scattering. *FEBS Lett.*: 162: 43-46.

Plietz, P.; Zirwer, D.; Scheier, B.; Gast, K.; Damashun, G. (1984). Shape, symmetry, hydration and structure of the legumin from *Vicia faba* in solution. *Biophys. Acta*: 784: 140-148.

Poduslo, J.F. (1981). Glycoprotein Molecular-Weight Estimation Using Sodium Dodecyl Sulfate-Pore Gradient Electrophoresis: Comparison of Tris-Glycine and Tris-Borate-EDTA Buffer Systems. *Anal.Biochem.*: 114: 131-139.

Poole, S. (1989). Review: The foam-enhancing properties of basic biopolymers. *International Journal of Food Science and Technology*: 24: 121-137.

Saio, K.; Sato, I.; Watanabe, T. (1974). Food use of soybean 7S and 11S Proteins. High Temperature expansion characteristics of gels. *J.Food Sci.*: 39: 777-782.

Sathe, S.K.; Lilley, G.G.; Mason, A.C.; Weaver, C.M. (1987). High-Resolution Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Soybean (*Glycine max* L.) Seed Proteins. *Cereal Chemistry*: 64(6): 380-384.

Sathe, S.K.; Mason, A.C.; Weaver, C.M. (1989) Thermal Aggregation of Soybean (*Glycine max* L.) Sulfur-rich Protein. *J.Food Sci.*: 54(2): 319-323;342.

Shiga, K.; Nakamura, Y. (1987). Relation Between Denaturation and Some Functional Properties of Soybean Protein. *J.Food Sci.*: 52(3): 681-684;690.

Shimizu, M.; Saito, M.; Yamauchi, K. (1986). Hydrophobicity and Emulsifying Activity of Milk Proteins. *Agric.Biol.Chem.*: 50(3): 791-792.

Staswick, P.E.; Hermodson, M.A.; Nielsen, N.C. (1981). Identification of the Acidic and Basic Subunit Complexes of Glycinin. *J.Biol.Chem.*: 256(16): 8752-8755.

Staswick, P.E.; Hermedson, M.A.; Nielsen, N.C. (1984). Identification of the cysteines which link acidic and basic components of the glycinin. *J.Biol.Chem.*: 259: 13431-13435.

Swift, C.E.; Lockett, C; Fryer, A.J. (1961). Comminuted meat emulsions. Capacity of meats for emulsifying fat. *Food Technol*: 15: 468-473.

Sykes, G.E.; Gayler, K.R. (1981). Detection and characterization of a new β -conglycinin from soybean seeds. *Arch.Biochem.Biophys.*: 210: 525.

Tanteeratarm, K.; Wei, L.S.; Steinberg, M.P. (1989). Effect of soybean maturity on storage stability and process quality. *J.Food Sci.*: 54: 589.

Thanh, V.H.; Shibasaki, K. (1976 a). Heterogeneity of β -conglycinin. *Biochim.*

Biophys. Acta; 439: 326-338.

Thanh, V.H.; Shibasaki, K. (1976 b). Major Proteins of Soybean Seeds. A Straightforward Fractionation and Their Characterization. *J.Agric.Food Chem.*: 24(6): 1117-1121.

Thanh, V.H.; Shibasaki, K. (1978). Major Proteins of Soybean Seeds. Subunit Structure of β -Conglycinin. *J.Agric.Food Chem.*: 26(3): 692-695.

Thanh, V.H.; Shibasaki, K. (1979). Major Proteins of Soybeans Seeds. Reversible and Irreversible Dissociation of B-Conglycinin. *J.Agric.Food Chem.*: 27(4): 805-809.

Thannhauser, T.W.; Konishi, Y.; Sheraga, H.A. (1984). Sensitive Quantitative Analysis of Disulfide Bonds in Polypeptides and Proteins. *Anal.Biochem.*: 138: 181-188.

Townsend, A.A.; Nakai, S. (1983). Relationships Between Hydrophobicity and Foaming Characteristics of Food Proteins. *J.Food Sci.*: 588-594.

Tumer, N.E.; Thanh, V.H.; Nielsen, N.C. (1981). Purification and characterization of mRNA from soybean seeds. *J. Biol. Chem.*: 256: 8756-8760.

Tumer, N.E.; Richter, J.D.; Nielsen, N.C. (1982). Structural characterization of glycinin precursors. *J. Biol. Chem.*: 257: 4016-4018.

Utsumi, S.; Mori, T. (1980). Heterogeneity of Broad Bean Legumin. *Biochim. Biophys. Acta*: 621: 179-189.

Utsumi, S.; Inaba, H.; Mori, T. (1981). Heterogeneity of soybean glycinin. *Phytochemistry*: 20: 585-589.

Utsumi, S.; Damodaran, S.; Kinsella, J.E. (1984). Heat-Induced Interactions between Soybean Proteins: Preferential Association of 11S Basic Subunits and β Subunits of 7S. *J.Agric.Food Chem.*: 32(6): 1406-1412.

Utsumi, S.; Kinsella, J.E. (1985 a). Forces Involved in Soy Protein Gelation: Effects of Various Reagents on the Formation, Hardness and Solubility of Heat-Induced Gels Made from 7S, 11S, and Soy Isolate. *J.Food Sci.*: 50: 1278-1282.

Utsumi, S.; Kinsella, J.E. (1985 b). Structure-function relationship in food proteins: subunit interactions in heat induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. *J.Agric.Food Chem.*: 33(2): 297-303.

Utsumi, S.; Kim, C.S.; Kohno, M.; Kito, M. (1987). Polymorphism and expression of cDNAs encoding glycinin subunits. *Agric.Biol.Chem.*: 51: 3267-3273.

Utsumi, S.; Kito, M. (1991). Improvement of Food Protein Functions by Chemical,

Physical, and Biological Modifications. *Comments Agricultural and Food Chemistry*: 2(4): 261-278.

Utsumi, S. (1992). Plant Food Protein Engineering. *Advances in Food and Nutrition Research*: 36: 89-208.

Van Kleef, F.S.M. (1986). Thermally Induced Protein Gelation: Gelation and Rheological Characterization of Highly Concentrated Ovalbumin and Soybean Protein Gels. *Biopolymers*: 25: 31-59.

Visser, A.; Thomas, A. (1987). Review: Soya Proteins Products -Their Processing, Functionality, and Application Aspects. *Food Reviews International*: 3: 1-32.

Voutsinas, L.P.; Nakai, S.; Harwalkar, V.R. (1983 a). Relationships Between Protein Hydrophobicity and Thermal Functional Properties of Food Proteins. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*: 16(3): 185-190.

Voutsinas, L.P.; Cheung, E.; Nakai, S. (1983 b). Relationships of Hydrophobicity to Emulsifying Properties of Heat Denatured Proteins. *J.Food Sci.*: 48: 26-32.

Waniska, K.D.; Kinsella, J.E. (1979). Foaming Properties of Proteins: evaluation of a column aeration apparatus using ovalbumin. *J.Food Sci.*; 1979; 44: 1398-1402.

Wang, C.H.; Damodaran, S. (1990). Thermal Gelation of Globular Proteins: Weight-Average Molecular Weight Dependence of Gel Strength. *J.Agric. Food Chem.*: 38(5): 1157-1164.

Wang, C.H.; Damodaran, S. (1991). Thermal Gelation of Globular Proteins: Influence of Protein Conformation on Gel Strength. *J.Agric.Food Chem.*: 39(3): 433-438.

Wolf, W.J.; Briggs, D.R. (1956). Ultracentrifugal investigation of the effect of neutral salts on the extraction of soybean proteins. *Arch.Biochem.Biophys.*: 63: 40-49.

Wolf, W.J.; Briggs, D.R. (1959). Purification and characterization of the 11S component of soybean proteins. *Arch.Biochem.Biophys.*: 85: 186-199.

Wolf, W.J. (1970). Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. *J.Agric.Food Chem.*: 18: 969.

Wolf, W.J. (1978). Purification and properties of the proteins. En "Soybeans: Chemistry and Technology" (edited by A.K. Smith and S.J. Circle, AVI Publishing Co, Westport, C.T.) pp 93-143.

Wright, D.J.; Leach, I.B.; Wilding, P. (1977). Differential Scanning Calorimetric Studies of Muscle and its Constituent Proteins. *J.Sci.Food Agric.*: 28: 557-564.

- Wright, D.J.** (1987). The seed globulins. En "Developments in Food Proteins-5" (B.J.F. Hudson, ed. Elsevier, London) pp. 81-157.
- Wright, D.J.** (1988). The seed globulins. En "Developments in Food Proteins-6" (B.J.F. Hudson, ed. Elsevier, London) pp. 119-178.
- Yamagishi, T.; Yamauchi, T.; Shibasaki, K.** (1980). Isolation and Partial Characterization of Heat Induced Products of Soybeans 11S Globulin and Their Analysis by Electrophoresis. *Agric.Biol.Chem.*: 44(7): 1575-1582.
- Yamagishi, T.; Yamauchi, F.; Shibasaki, K.** (1981 a). Electrophoretical and Differential Thermal Analysis of Soybean 11S Globulin Heated in the Presence of N-Ethylmaleimide. *Agric.Biol.Chem.*: 45(7): 1661-1668.
- Yamagishi, T.; Yamauchi, F.; Shibasaki, K.** (1981 b). State of Aromatic Amino Acid Residues in Soybean 11S Globulin Heated in the Presence of N-Ethylmaleimide by Derivative Spectrophotometry. *Agric.Biol.Chem.*: 45(2): 459-467.
- Yamagishi, T.; Yamauchi, F.; Shibasaki, K.** (1982 a). Effect of Sulphydryl and Disulphide Compounds on the Formation and Quality of Thermal Aggregates of Soya Bean 11S Globulin. *J.Sci.Food Agric.*: 33: 1092-1100.
- Yamagishi, T.; Ebina, F.; Yamauchi, F.** (1982 b). Analysis of the State of Aromatic Amino Acid Residues in Heated Soybean 7S Globulin by Absorption Derivative Spectrophotometry and Spectrofluorimetry. *Agric.Biol.Chem.*: 46(10): 2441-2448.
- Yamagishi, T.; Miyakawa, A.; Noda, N.; Yamauchi, F.** (1983 a). Isolation and Electrophoretic Analysis of Heat-Induced Products of Mixed Soybean 7S and 11S Globulins. *Agric.Biol.Chem.*: 47(6): 1229-1237.
- Yamagishi, T.; Tomisawa, T.; Yamauchi, F.** (1983 b). Spectroscopic Studies on the Aggregates and the Dissociates Induced by Heating Soybean 11S Globulin in the Presence of N- Ethylmaleimide. *Agric.Biol.Chem.*: 47(11): 2475-2481.
- Yamagishi, T.; Takaya, M.; Ebina, F.; Yamauchi, F.** (1984). Effect of Heating Temperature on Sulphydryl and Disulfide Contents and State of Aromatic Amino Acid Residues in Soybean Protein. *Agric.Biol.Chem.*: 48(2): 537-539.
- Yamagishi, T.; Takahashi, N.; Yamauchi, F.** (1987). Covalent Polymerization of Acidic Subunits on Heat-Induced Gelation of Soybean Glycinin. *Cereal Chemistry.*: 64(4): 207-212.
- Yamauchi, F.; Sato, M.; Sato, W.; Kamata, K.; Shibasaki, K.** (1981). Isolation and

Identification of a New Type of β -Conglycinin in Soybean Globulins. *Agric.Biol. Chem.*: 45(12): 2863-2868.

Yamauchi, F.; Sato, K.; Yamagishi, T. (1984). Isolation and purification of a salt extractable globulin from soybean seed. *Agric.Biol.Chem.*: 48: 645-650.

Yamauchi, F.; Yamagishi, T.; Iwabuchi, S. (1991). Molecular Understanding of Heat-Induced Phenomena of Soybean Protein. *Food Reviews International*: 7(3): 283-322.

Yao, J; Wei, L.S.; Steinberg, M.P. (1983). Effect of Maturity on Chemical Composition and Storage Stability of Soybeans. *J.Am.Oil Chem. Soc.*: 60(7): 1245-1249.

Yao, J.J.; Wei, L.S.; Steinberg, M.P. (1988). Water-Imbibing Capacity and Rheological Properties of Isolated Soy Proteins. *J.Food Sci.*: 53(2): 464-467.

Yao, J.J.; Tanteeratarm, K.; Wei, L.S. (1990). Effects of Maturation and Storage on Solubility, Emulsion Stability and Gelation Properties of Isolated Soy Proteins. *J.Am.Oil Chem. Soc.*: 67(12): 974-979.

*usted aprende
y usa lo aprendido
para volverse lentamente sabio
para saber que al fin el mundo es esto
en su mejor momento una nostalgia
en su peor momento un desamparo
y siempre siempre
un lío*

Mario Benedetti